

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO DE BETA-GLUCANOS EM LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS ALIMENTADOS COM  
DIETAS COM DIFERENTES DENSIDADES NUTRICIONAIS**

MAYRA ANTON DIB SALEH

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

BOTUCATU - SP  
Janeiro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Saleh, Mayra Anton Dib.

Ação de beta-glucanos em leitões recém-desmamados alimentados com dietas com diferentes densidades nutricionais / Mayra Anton Dib Saleh. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Dirlei Antonio Berto

Capes: 50403001

1. Suíno. 2. Leitão (Suíno) - Desmame precoce. 3. Nutrição animal - Necessidades. 4. Morfometria. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Aditivos; Imunologia; Morfometria; Nutrição de suínos.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO DE BETA-GLUCANOS EM LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS ALIMENTADOS COM  
DIETAS COM DIFERENTES DENSIDADES NUTRICIONAIS**

MAYRA ANTON DIB SALEH  
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto

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

BOTUCATU - SP  
Janeiro – 2014

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Ramona Anton Saleh, minha avó, Delmira Rodriguez Anton e meu irmão, Leandro Anton Dib Saleh, por todo amor, apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos, principalmente durante minha vida acadêmica e, especialmente nos últimos meses do curso. Eu amo muito vocês.

Ao meu pai, João Dib Saleh Neto, *in memoriam*, pelo grande exemplo e por todos os dias que estive ao meu lado. Você vive no meu coração. Eu te amo muito.

Ao meu querido orientador e amigo, Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto pela oportunidade, confiança, paciência, pelos ensinamentos, valiosos conselhos e inestimável ajuda. Muito obrigada, eu admiro-lhe muito!

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu, pela oportunidade de realização deste curso e de melhorar meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos (Processo: 2011/50461-9) e pelo suporte financeiro (Processo: 2012/03146-3).

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela orientação, apoio e colaboração na realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela orientação, apoio e colaboração na elaboração dos protocolos experimentais.

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha, Prof. Dr. Paulo Roberto de Lima Meirelles, Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino, Prof. Dr. Bruno César Schimming e Prof. Dr. José Ricardo de Carvalho Pinto e Silva, pelo apoio e colaboração no decorrer dos experimentos.

Às profissionais Eliane, Carla e Joana do Laboratório de Análises Veterinárias Vidavet, pela solicitude e apoio com as análises laboratoriais.

Ao Carlos Alberto Ferreira Oliveira e Felipe de Conti Horta, pela amizade e fornecimento da fonte de beta-glucanos utilizada nos experimentos.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, Carlos Pazini Júnior, Seila Cristina Cassineli Vieira e Aline Couto, pela atenção e auxílios prestados.

Aos funcionários e técnicos da UNESP/FMVZ: Renato, Paulinho, Marcão, Adriano, Franco, Sérgio, Nico e Wilson, pela amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Aos amigos de Pós-graduação Mayara, Alessandro, Henrique, Diego, Marco Aurélio, Gabriela, Luan, Filipe, Vitor e Caroline, pela amizade e ajuda ao longo do Doutorado e especialmente na condução dos experimentos.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desta tese.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
2. Sistema imune .....	
2.1 Particularidades da imunologia suína – imunidade inata .....	4
2.2 Particularidades da imunologia suína – imunidade adquirida .....	11
3. Imunonutrientes na nutrição de leitões.....	14
3.1 Minerais e vitaminas.....	15
3.2 Aminoácidos.....	16
3.3 Lipídeos.....	18
4. Densidade nutricional das dietas .....	19
5. Beta-glucanos.....	19
5.1 Ações e efeitos em reações imunológicas.....	22
6. Objetivos.....	23
7. Referências bibliográficas .....	24
 CAPÍTULO 2.....	 31
EFEITO DE BETA-GLUCANOS E DA DENSIDADE NUTRICIONAL DA DIETA SOBRE O DESEMPENHO, PESO DE ÓRGÃOS E MORFOMETRIA INTESTINAL DE LEITÕES IMUNOLOGICAMENTE DESAFIADOS.....	32
Resumo .....	32
Abstract .....	33
1. Introdução.....	34
2. Material e Métodos .....	35
2.1 Experimento I .....	35
2.2 Experimento II .....	38
3. Resultados e Discussão.....	40
3.1 Desempenho .....	40
3.2 Pesagem de órgãos e morfometria intestinal.....	42
4. Conclusões .....	47
5. Referências.....	47

**SUMÁRIO**

	Página
CAPÍTULO 3.....	52
EFEITO DE BETA-GLUCANOS E DA DENSIDADE NUTRICIONAL DA DIETA SOBRE OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE LEITÕES IMUNOLOGICAMENTE DESAFIADOS .....	53
Resumo .....	53
Abstract .....	54
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos .....	56
3. Resultados e Discussão.....	60
3.1 Eritrograma.....	60
3.2 Leucograma .....	62
3.3 Anticorpos .....	62
3.4 Bioquímica.....	65
4. Conclusões .....	71
5. Referências.....	71
ANEXO 1 .....	75
CAPÍTULO 4.....	77
IMPLICAÇÕES .....	78

## LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2.....	31
<b>Tabela 1.</b> Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).....	36
<b>Tabela 2.</b> Valores nutricionais calculados das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).....	37
<b>Tabela 3.</b> Registro das temperaturas máxima e mínima durante o experimento	38
<b>Tabela 4.</b> Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre o desempenho de leitões.....	41
<b>Tabela 5.</b> Pesos absolutos e relativos de órgãos de leitões em função da época de abate, densidade nutricional e nível de beta-glucano das dietas.....	43
<b>Tabela 6.</b> Avaliações morfométricas do duodeno, jejuno e íleo de leitões em função da época de abate, densidade nutricional e nível de beta-glucano das dietas.....	44
 CAPÍTULO 3.....	 52
<b>Tabela 1.</b> Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).....	57
<b>Tabela 2.</b> Valores nutricionais calculados das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).....	58
<b>Tabela 3.</b> Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre o eritrograma de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.....	61
<b>Tabela 4.</b> Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre o leucograma de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.....	63
<b>Tabela 5.</b> Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre os níveis de anticorpos de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.....	66



## LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 3.....	52
<b>Tabela 6.</b> Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre os parâmetros bioquímicos de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.....	69
<b>Tabela 7.</b> Valores de referência para os parâmetros eritroleucométricos e bioquímicos de suínos .....	76

## LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
<b>Figura 1.</b> Mecanismos inespecíficos e específicos da resposta imune.....	3
CAPÍTULO 3.....	52
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo das colheitas de sangue e das análises realizadas .....	59

## **CAPÍTULO 1**

## Considerações iniciais

O sistema imunológico do leitão ao nascimento é anatômico e funcionalmente imaturo e, sua sobrevivência e defesa imunológica são dependentes da transferência passiva de anticorpos maternos através do colostro (BLECHA et al., 1983; STOKES & BOURNE, 1989). Os leitões são vulneráveis ao desafio imposto por microrganismos patogênicos durante o período em que os níveis de anticorpos decrescem no leite e no período anterior ao desenvolvimento de mecanismos de imunidade ativa. Essa imunidade, segundo Brown et al. (1961), só confere grau satisfatório de proteção por volta de 35 dias de idade.

Vários aspectos do desenvolvimento do sistema imune do suíno contribuem para a sua imunocompetência, o que apresenta impacto significativo sobre a sobrevivência dos leitões. O tipo de placentação epitélio-corial não permite a passagem de anticorpos maternos (imunoglobulinas) para o feto e, portanto, o leitão nasce sem a proteção conferida pela imunidade passiva (HOLLAND, 1990; PUPA et al., 2004). Ao mesmo tempo, com intuito de aumentar a produtividade das matrizes e melhorar a eficiência de uso das instalações de maternidade, o desmame antecipado dos leitões com idade, em torno de três semanas, é prática comum nas granjas. Os leitões recém-desmamados, portanto, além de possuírem menor capacidade de resposta imune, apresentam outros agravantes como dificuldade em secretar ácido clorídrico suficiente para reduzir o pH estomacal em níveis adequados para o início do processo de digestão protéica e auxiliar no controle de microrganismos patogênicos, redução das secreções de enzimas digestivas e alterações morfológicas na mucosa intestinal, predispondo-os a quadros de diarreias (RIBEIRO et al., 2008).

A ativação dos mecanismos de resposta imune impõe a demanda por nutrientes que, ao invés de serem direcionados para o crescimento dos leitões, são redirecionados para auxiliar a resposta do sistema imune do hospedeiro contra agentes patogênicos (JOHNSON et al., 2001). O desafio sanitário ativa a resposta inflamatória que, por sua vez, aumenta a necessidade de energia e de nutrientes específicos para a síntese dos constituintes de defesa (BARACOS et al., 1987) e, simultaneamente, reduz a ingestão de alimento comprometendo o desempenho animal (JOHNSON, 1997; LE DIVIDICH & SEVE, 2000).

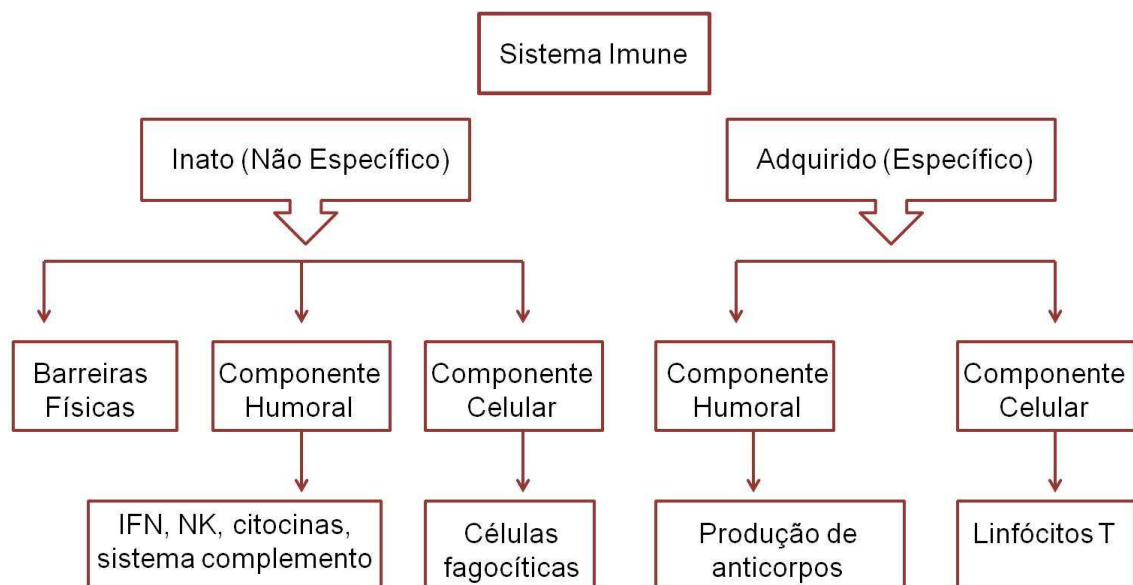
A nutrição, portanto, exerce influência na modulação do sistema imune e na melhoria da resistência dos animais à infecção, já que nutrientes são necessários para a multiplicação celular durante a resposta imune (fagócitos, linfócitos) e síntese de

moléculas efetoras (anticorpos, sistema complemento, óxido nítrico, lisozimas) ou de moléculas relacionadas à comunicação celular (citocinas, mediadores inflamatórios) (JOHNSON et al., 2001 e VOLMAN et al., 2008). Os nutrientes também exercem efeito indireto na resposta imune ao modificarem as vias de comunicação celular (citocinas) ou limitar efeitos indesejáveis de moléculas efetoras (JOHNSON et al., 2001).

A modulação do sistema imune pode ser beneficiada pela utilização de agentes como os beta-glucanos, que contribuem para o aumento da resistência às infecções por aumentar a atividade dos leucócitos, explosão respiratória (*respiratory burst*), produção de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores de função antimicrobiana (VOLMAN et al., 2008).

## 2. Sistema imune

O sistema imune é o responsável pela elaboração da resposta imunológica, composta por mecanismos de defesa inespecíficos e específicos (Figura 1), que visam primariamente reconhecer e diferenciar o estímulo ao qual é submetido, distinguindo estruturas próprias das de agentes estranhos e, em seguida, combater o agente agressor (antígeno), seja ele vírus, bactéria, fungo, protozoário, toxina ou qualquer substância estranha. Após a identificação do antígeno, o sistema imune busca neutralizar os efeitos prejudiciais de moléculas isoladas e destruir os microrganismos (TIZARD, 2008; VOLMAN et al., 2008).



**Figura 1.** Mecanismos inespecíficos e específicos da resposta imune.

Segundo Wood (2006), a resposta à infecção pode ser, resumidamente, dividida em cinco estágios:

1) Sensibilização à infecção, pois o organismo não consegue desenvolver resposta defensiva contra o patógeno até que reconheça sua presença;

2) Resposta imediata à infecção, o que envolve a atividade de células e outros fatores presentes no momento da infecção, mas que necessitam de recrutamento ao local de infecção e consequente ativação;

3) Resposta tardia à infecção, ativada quando a resposta imediata à infecção não é efetiva na eliminação do patógeno, se caracteriza por geração de novas células e fatores para conterem a infecção;

4) Destruição ou eliminação do patógeno, contudo, quando os patógenos produzem poderosas toxinas, torna-se mais benéfico ao organismo primeiramente neutralizar as toxinas antes de destruir ou eliminar o patógeno e;

5) Desenvolvimento de memória imunológica, por replicação e expansão clonal dos linfócitos B e T.

## **2.1 Particularidades da imunologia suína - imunidade inata**

Durante a vida uterina, os leitões estão protegidos do estímulo antigênico externo, em função da característica epitélio-corial da placenta materna. Essa barreira física de proteção impede a transferência de imunoglobulinas da porca aos fetos, via placenta. Assim, o leitão nasce imunologicamente despreparado e é extremamente dependente da imunidade passiva transferida pela porca, via colostro (BROWN et al., 1961; VARLEY, 1995).

A imunidade passiva é adquirida pelos leitões através dos anticorpos presentes no colostro nas primeiras 24 a 36 horas após o nascimento (BROWN et al., 1961). No entanto, conforme Gaskins (1998), o desenvolvimento e as alterações ocorridas no intestino de recém-nascidos podem influenciar a aquisição de anticorpos maternos e a absorção máxima de imunoglobulinas no prazo de 4 a 12 horas após a primeira mamada, declinando rapidamente após esse período (VARLEY, 1995).

A sobrevivência do leitão, portanto, não depende somente da ingestão dessas macromoléculas, mas também de sua própria capacidade em utilizá-las. A capacidade de resposta imune do leitão, no entanto, é bastante limitada, principalmente em virtude da imaturidade do sistema imunológico, que passa por mudanças nas primeiras semanas de vida, incluindo o aumento do número circulante de neutrófilos e da habilidade de resposta aos estímulos externos (MILLER & STOKES, 1993).

Além disso, o estado imunológico dos leitões pode ser influenciado por fatores ambientais, que podem resultar em quadro de imunossupressão e, por conseqüência, reduzir a resistência do animal a agentes infecciosos, aumentando a incidência de doenças (ENGLISH, 1998).

Os estressores de origem física são os principais causadores de depressão do sistema imune dos leitões. Além dos estressores físicos (mudança de ambiente e no tipo de alimento, separação da porca), há os de origem social, como a alteração da hierarquia após o desmame, quando se introduz animais novos ao grupo, decorrente da prática de manejo de transferência lateral de leitões.

Quanto à nutrição, um dos maiores problemas do desmame de leitões decorre do baixo consumo de alimento ou anorexia transitória, resultante da deficiência de energia que, por sua vez, pode levar à redução do crescimento (GRAÑA, 2007). O fato dos leitões recém-desmamados possuírem sistema digestório imaturo, baixa produção enzimática e de ácido clorídrico, causa prejuízos na digestão de proteínas, carboidratos e gorduras provenientes dos ingredientes de origem vegetal da dieta ofertada ao leitão recém-desmamado, sobretudo, em idade antecipada.

Estudos têm demonstrado que, ao desmame, o epitélio do intestino delgado dos leitões, geralmente, sofre redução na altura das vilosidades e aumento da profundidade das criptas. Mudanças essas associadas à diminuição do consumo voluntário, à capacidade de absorção e ao aumento da ocorrência de diarréias (JOHNSON et al., 2001), sendo essas mudanças morfológicas no intestino decorrentes, principalmente, do estresse ao desmame e da exposição do trato digestório à nova dieta.

A maioria dos microrganismos patogênicos que infectam o animal encontra defesas inespecíficas persistentes. A inespecificidade de defesa do hospedeiro constitui a imunidade inata, por ser inerente ao organismo e pela capacidade de resposta não mudar ou adaptar-se de uma infecção para outra (COLDITZ, 2002; WOOD, 2006).

A primeira estratégia de defesa do organismo são as barreiras físicas à invasão. O epitélio fornece barreira física efetiva à entrada de microrganismos e produz diversos fatores antimicrobianos. Nas outras superfícies corpóreas, as defesas físicas incluem o processo de autolimpeza, tosse, espirro e fluxo de muco no trato respiratório, vômito e diarréia no trato gastrointestinal, fluxo urinário e baixo pH no sistema urinário (WOOD, 2006).

A presença de uma flora normal estabelecida também elimina muitos invasores potenciais, a exemplo da flora bacteriana residente na pele que exclui competitivamente outras bactérias e fungos, ou mesmo, a flora bacteriana intestinal que compete com bactérias patogênicas e mantém a tensão de oxigênio baixa, além da ação protetora complementar desencadeada por células especializadas do epitélio intestinal, as células de Paneth, responsáveis pela secreção de  $\alpha$ -defensinas, como as criptidinas e lisozimas (COLDITZ, 2002).

As barreiras físicas por si só não evitam a entrada de microrganismos prejudiciais ao animal. Desta forma, mecanismos químicos e celulares de defesa são ativados para reconhecer quimicamente os componentes normais do organismo animal e, dessa forma, liberar enzimas capazes de digerir a parede celular das bactérias ou capazes de digerir carboidratos (lisozimas) e ainda de destruir vários vírus (TIZARD, 2008).

Outra habilidade do organismo é conter a infecção por meio do isolamento da mesma garantida pela inflamação, o que impede a dispersão dos patógenos para áreas não infectadas do corpo. Para que isto seja possível, há necessidade de captura e ataque dos patógenos que conseguiram penetrar nos tecidos por células fagocíticas pertencentes a dois sistemas complementares: 1) o sistema mielóide subdividido em 1a) grupo de células fagocíticas de ação rápida, mas incapazes de um esforço prolongado, representado pelos neutrófilos, basófilos e eosinófilos e, 1b) grupo composto por células de ação mais lenta e de poder fagocitário mais prolongado, sendo representado pelos macrófagos e, ainda pelo sistema linfóide (2), constituído pelas células *natural killer* (WOOD, 2006; TIZARD, 2008).

As células fagocíticas são normalmente encontradas no sangue e devem migrar para o local da infecção para destruir os invasores. Dessa maneira, após a lesão, ocorre constrição transitória das arteríolas locais, seguida pela dilatação de todos os pequenos vasos sanguíneos lesados, por ação de moléculas vasoativas, a exemplo das aminas (histamina e serotonina), lipídeos vasoativos (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas), polipeptídeos vasoativos (cininas e anafilatoxinas), fator ativador plaquetário (PAF) e componentes do complemento sérico ( $C_{3a}$  e  $C_{5a}$ ) (TIZARD, 2008). Há, então, aumento da permeabilidade vascular, no qual as células endoteliais e perivasculares se contraem de tal forma que o fluido escapa através dos espaços intercelulares. Ao mesmo tempo, essas mudanças nos vasos permitem que os neutrófilos e monócitos movam-se gradualmente em baixíssima velocidade (estágio denominado “rolamento”) até aderirem-se às células endoteliais. Em seguida, migram



para os tecidos, atravessando as fendas entre as células endoteliais, concluindo o processo de diapedese. Todo esse processo só é possível mediante aumento da expressão de selectinas P e L, PAF e integrinas (OSBORN, 1990).

O acúmulo e ativação de células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) no local da injúria contribue para a eliminação de microrganismos por meio do processo denominado fagocitose (interiorização e destruição dos patógenos). Uma vez fagocitados, os patógenos permanecem no interior da membrana citoplasmática do fagossomo (vacúolo fagocitário). Quando internalizados, esses fagossomos então se fundem aos lisossomos (grânulos citoplasmáticos) pré-formados que possuem várias proteases. A ativação dos fagócitos, a exemplo da sinalização por meio das proteínas de membrana TLR (*toll like receptors*), resulta na ativação do complexo da NADPH-oxidase na membrana do fagossomo e no interior da membrana plasmática catalisando a redução do oxigênio ( $O_2$ ) a radical superóxido ( $O_2^-$ ) (VOLMAN et al., 2008).

O radical superóxido é então simultaneamente reduzido e oxidado (dismutação) para produzir peróxido de hidrogênio, potente oxidante parcialmente responsável pela morte dos patógenos (VOLMAN et al., 2008). No entanto, a mieloperoxidase, presente no interior dos fagossomos, utiliza o peróxido de hidrogênio para produzir antimicrobiano mais potente, o ácido hipocloroso (HClO). Esse processo de produção de oxidantes após ativação e fagocitose por neutrófilos e macrófagos rapidamente utiliza grandes quantidades de oxigênio disponível e, por essa razão é denominado de explosão respiratória ou *respiratory burst* (DE LEO et al., 1999; VOLMAN et al., 2008).

Após a ativação dos fagócitos, a forma induzível do óxido nítrico sintetase (iNOS) é também expressa, resultando na produção de radicais livres de óxido nítrico (NO), que reagem com o superóxido formando o metabólito tóxico peroxinitrito. Esses vários oxidantes não ficam contidos somente no fagossomo, são também liberados das células, contribuindo para a morte dos patógenos adjacentes, o que inevitavelmente, acarreta danos oxidativos aos tecidos circundantes (EISERICH et al., 1998; PIBOT et al., 2008).

Para se protegerem do massivo dano oxidativo autógeno, os fagócitos necessitam de concentrações significativas de antioxidantes citossólicos (hidrossolúveis) e de membrana (lipossolúveis), que são degradados e rapidamente repostos durante a explosão respiratória. Os antioxidantes mais importantes nesse

processo são a glutathione peroxidase, o ascorbato e o tocoferol (EISERICH et al., 1998; VOLMAN et al., 2008).

O sistema imune inato também atua para recrutar respostas antígeno-específicas, não só por atrair células do sistema imune para o local da infecção, mas também por meio da captação do antígeno pelas células dendríticas, transportadoras do antígeno para tecidos linfóides, onde as respostas primárias são iniciadas (WOOD, 2006).

As células dendríticas também produzem citocinas que regulam a qualidade da resposta imune para que esta seja mais adequada no combate ao patógeno (ADACHI et al., 1994; WOOD, 2006; VOLMAN et al., 2008). Nos suínos, as células dendríticas são derivadas da medula óssea, sendo representadas pelas  $SWC_3^+$ ,  $CD_1^+$ ,  $CD_{80/86}^+$ ,  $CD_{14}^+$  e  $CD_{16}^+$  (SINKORA & BUTLER, 2009).

As citocinas inflamatórias, além de mediar a comunicação entre os leucócitos, agem também como hormônios, possibilitando a comunicação do sistema imunológico com outros sistemas fisiológicos (nervoso e digestório), permitindo o restabelecimento de prioridades biológicas do animal em resposta à infecção (ADACHI et al., 1994). Dessa forma, o animal responde à inflamação ou lesão tecidual sintetizando novas proteínas e gerando respostas que auxiliam na proteção do corpo. Essas respostas sistêmicas incluem reações como a febre, neutrofilia (liberação de maior quantidade de neutrófilos sequestrados do interior da circulação pela medula óssea), letargia e eventual emaciação muscular (resultado do aumento do catabolismo protéico, que mobiliza aminoácidos para o aumento da síntese de anticorpos). Essas respostas são mediadas por citocinas secretadas pelos macrófagos, destacando-se a IL-1; IL-6 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) (TIZARD, 2008).

Outra alteração metabólica marcante durante a infecção é a síntese e secreção de proteínas pelo fígado, conhecidas por proteínas de fase aguda, as quais incluem componentes do sistema complemento, fatores de coagulação, inibidores de proteases e proteínas conjugadoras de metais (COLDITZ, 2002; WOOD, 2006).

A proteína de fase aguda de maior destaque em suínos é a proteína C reativa, que em associação à fosfatidilcolina, ativa linfócitos para combater organismos patogênicos (TIZARD, 2008). Pode ainda se conjugar aos neutrófilos e promover a fagocitose, a remoção de células e microrganismos danificados ou em processo de morte, inibir a produção de superóxido e a degranulação neutrofílica, promovendo cicatrização tecidual por meio do aumento do reparo do tecido lesado e, ainda pode se

conjugar com constituintes nucleares, como a cromatina, histonas e riboproteínas de forma a regular a resposta de autoanticorpos a antígenos (KUSHNER, 1990).

Nos suínos, as proteínas de fase aguda incluem ainda as haptoglobulinas, glicoproteínas solúveis ao ácido, glicoproteínas  $\alpha_1$ -ácidas, ceruloplasminas e  $\alpha_2$ -globulinas séricas. Além disso, existem algumas proteínas cujos níveis diminuem durante a inflamação aguda, as chamadas proteínas de fase aguda negativa, que nos suínos incluem as albuminas,  $\alpha$ -lipoproteínas, fetuínas e transferrinas (KUSHNER, 1990).

Além da reação inata do organismo à invasão, como a inflamação e mobilização de células fagocíticas, o animal também desenvolve uma resposta defensiva a partir da experiência prévia para o combate a invasões subsequentes. Neste contexto, porções selecionadas dos microrganismos invasores são processadas e apresentadas às células sensíveis a antígenos do sistema imune. Essa apresentação de antígenos envolve sua quebra em fragmentos e alocação em sítios de conjugação nos receptores de superfície (chamados de moléculas de histocompatibilidade) de células especializadas, denominadas células apresentadoras de antígenos (TIZARD, 2008).

As moléculas de histocompatibilidade são receptores glicoprotéicos codificados por genes situados em um complexo gênico chamado de Complexo de Histocompatibilidade Maior (CHM). Este complexo fornece o principal componente genético de susceptibilidade às doenças ou resistência às infecções e doenças autoimunes, nas quais as respostas imunes exercem papel significativo (TIZARD, 2008).

As moléculas de CHM das classes I e II são receptores que se conjugam aos fragmentos do antígeno e os apresentam aos linfócitos, regulando efetivamente as respostas imunes. Cada CHM varia de nome entre as espécies, sendo chamado de SLA (*Swine Leukocyte Antigen*) nos suínos. As moléculas de CHM classe I em suínos são detectadas na maioria das células nucleadas, com destaque para os linfócitos, plaquetas, granulócitos, hepatócitos, células renais e espermatozóides e seu arranjo gênico (número de genes alelos encontrados no *locus*) é baixo, de apenas doze genes, sendo apenas quatro funcionais (VAIMAN et al., 1998).

As moléculas de CHM classe II nos suínos são expressas em quase todas as células T adultas em repouso, na mesma proporção que são expressas nos macrófagos e, também em grande quantidade no endotélio vascular renal e nos glomérulos, fato de importância na rejeição de transplantes renais. O complexo SLA

influencia ainda parâmetros reprodutivos, tais como a taxa de ovulação, tamanho da leitegada e viabilidade dos leitões. Isso pode ser decorrente do papel exercido na biossíntese de esteróides pela 21-hidroxilase, cujo gene se localiza na região de classe III do SLA. Os níveis séricos de imunoglobulinas também são afetados em parte pelo haplótipo (conjunto completo de alelos) do SLA em suínos (VAIMAN et al., 1998).

Outros dois tipos de componentes do sistema inato são os interferons (IFN) e as células *natural killer* (NK). Os IFN são citocinas que inibem a replicação viral em células infectadas e podem ser secretados pelas células ou ligar-se a receptores específicos em outras células, tornando-as ativadas à infecção. Existem três tipos principais de IFN: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  (produzidos por macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células dendríticas) e IFN- $\gamma$  (produzido por linfócitos e células NK) (VOLMAN et al., 2008).

As células NK representam 1 a 10% do total de células brancas do organismo animal e são descritas por sua habilidade em destruir outras células, especialmente células cancerosas. Têm papel importante na resistência às infecções virais, bacterianas e por protozoários, além do papel nas respostas inflamatórias. Quando presentes no sítio da inflamação podem ser estimuladas pela citocina IL-12 (produzida por macrófagos ativados) e produzir IFN- $\gamma$ , potente ativador de macrófagos. Dessa maneira, esse processo amplifica a ativação dos macrófagos e células NK, o que auxilia na resistência à infecção (WOOD, 2006).

As células NK em suínos representam 15% do total de linfócitos e são distinguidas pelo complexo fenótipo das perforinas sendo elas as  $CD_2^+$ ,  $CD_3^-$ , encontradas no CHM classe II e  $LFA-I^+$  (*Lymphocyte Function-Associated Antigen*), no baço e sangue periférico, sendo também encontradas nos linfonodos ou no timo em pequenas quantidades (SINKORA & BUTLER, 2009). Recentes estudos, revisados por Gerner et al. (2009), ainda citam as  $CD_4^-$ ,  $CD_5^-$ ,  $CD_6^-$ ,  $CD_{8\alpha}^+$ ,  $CD_{8\beta}^-$ ,  $CD_{11\beta}^+$  e  $CD_{16}^+$ .

Para haver interação das células apresentadoras de antígenos, antígenos processados e os linfócitos é necessário que o organismo tenha ambiente propício para esta interação e regulação. Esse ambiente é denominado de sistema linfóide, subdividido em primário e secundário, os quais são respectivamente, locais de produção e maturação de linfócitos B e T, células constituintes da segunda defesa do organismo, a imunidade adquirida.

## 2.2 Particularidades da imunologia suína - imunidade adquirida

Alguns patógenos, a exemplo dos vírus, não são reconhecidos pelo sistema imune inato por não possuírem substâncias diferentes daquelas do hospedeiro. Por outro lado, o organismo do animal possui um sistema imune específico capaz de distinguir moléculas de patógenos, mesmo que elas sejam muito similares às do hospedeiro, atuando na neutralização dos efeitos prejudiciais destes microrganismos patogênicos por meio da ação de células leucocitárias chamadas de linfócitos. Existem duas populações deste tipo celular, os linfócitos B e T (FERREIRA & SOUSA, 2002; WOOD, 2006).

Os linfócitos B se diferenciam na medula óssea e são responsáveis pela produção de importantes glicoproteínas que fazem parte do sistema imune específico, os anticorpos. Estes possuem a habilidade de reconhecer moléculas estranhas, antígenos ou toxinas que podem estar na superfície dos patógenos (WOOD, 2006), sendo um dos mecanismos mais eficientes de defesa do organismo animal (FERREIRA & SOUSA, 2002).

Os anticorpos são subdivididos em várias classes denominadas: IgG, constituída por cinco subclasses (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>) sendo esta, a classe predominante no soro (85%); IgM, produzida depois de um primeiro contato com um novo antígeno, correspondendo a 12% no soro; IgA, constituída por uma subclasse, que é dimérica (IgA<sup>a</sup> e IgA<sup>b</sup>), representa cerca de 3% das imunoglobulinas do soro, sendo encontrada em secreções como o muco dos tratos respiratório e intestinal, saliva, suor, leite e colostro; IgE, identificada tardiamente em comparação com as anteriores, apresenta grande capacidade de expansão clonal e de respostas mediadas por células contra antígenos, está presente em menor concentração no plasma, envolvida em processos alérgicos e asmáticos e ainda, a IgD, ausente em suínos, assim como, em bovinos e coelhos (VARLEY, 1995; WOOD, 2006; BARCELLOS et al., 2007).

Já os receptores antigênicos de células B são produzidos em grande quantidade pelas células plasmáticas em resposta à ação dos anticorpos e são constituídos por quatro cadeias peptídicas, sendo duas leves ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) e duas pesadas, que apresentam outros cinco tipos diferentes ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ) (THACKER, 2004; GUEDES & FRANÇA, 2007).

Outro tipo celular são os linfócitos T, que possuem precursores originados na medula óssea e migram ao timo para completar sua maturação. Quando maduros e ativados, se diferenciam em células que podem destruir as células infectadas

(linfócitos T CD<sub>8</sub> citotóxicos) ou ativar outras células, como os linfócitos T CD<sub>4</sub> auxiliares, de modo que as células B e T são responsáveis pela imunidade humoral e celular, respectivamente (VOLMAN et al., 2008; FORT, 2010).

Nas células T são encontrados os receptores antigênicos (TCR), constituídos por duas cadeias peptídicas conjugadoras de antígenos associadas às glicoproteínas ( $\alpha/\beta$ ,  $\gamma/\delta$ ). Cada célula T somente responde a um antígeno, pois na mesma célula os receptores TCR são idênticos. Para identificação dos antígenos, os receptores TCR são complexados a um grupo de glicoproteínas ligadas ao CHM, sendo os mais comuns o CD<sub>4</sub>, ligado ao CHM II e o CD<sub>8</sub>, ligado ao CHM I (HURLEY, 2004; THACKER, 2004; GUEDES & FRANÇA, 2007).

Os suínos possuem linfonodos acelulares, sendo a única espécie em que os leucócitos de mucosa circulam na corrente sanguínea, em razão da quantidade de leucócitos circulantes ser maior em comparação com as demais espécies. Os linfócitos são produzidos e diferenciados pelos órgãos linfóides primários que são representados pelo timo, placas de Peyer e glândulas linfoepiteliais. Nessa espécie, os linfócitos T amadurecem no timo, já os linfócitos B amadurecem nas placas de Peyer (SINKORA & BUTLER, 2009).

O timo localiza-se no mediastino anterior, estendendo-se até a altura da glândula tireóide no pescoço. Aos 36 dias de gestação está completamente formado, apresentando crescimento alométrico dos 36 aos 114 dias de gestação. Apresenta maior tamanho em recém-nascidos, a partir de então sofre redução até a puberdade quando atrofia, sendo seu córtex substituído por tecido adiposo. A sua principal função é a produção de linfócitos T em animais jovens, além da produção de hormônios que auxiliam na restauração das células tímicas e na manutenção da função dos linfócitos T (SINKORA & BUTLER, 2009; ROTHKÖTTER, 2009).

Em suínos, há diferentes tipos de placas de Peyer (PP), apresentando a PP jejunal, ileal, a do cólon ascendente e do cólon descendente, estando as duas primeiras situadas no intestino delgado, com desenvolvimento pré-natal (40 dias antes do nascimento) e as duas últimas, no intestino grosso, desenvolvem-se no período perinatal (ROTHKÖTTER, 2009).

As placas de Peyer são grandes massas linfóides encontradas nas paredes intestinais e, em suínos, estão concentradas no íleo (80 a 90%) estendendo-se até a junção ileocecal, correspondendo ao local de proliferação rápida de linfócitos B, além de existir porções de PP no jejuno que se apresentam como um discreto acúmulo de múltiplos folículos. É o único tecido linfóide que não possui vasos linfáticos aferentes.

Assim a circulação de linfócitos ocorre através da corrente sanguínea (GUEDES & FRANÇA, 2007).

Nos leitões, as PP ileocecais não possuem linfócitos T e têm cerca de 2 m de comprimento, desenvolvendo-se bem antes do nascimento. Já as placas jejunais se apresentam como múltiplos folículos (cerca de 30) de estrutura convencional e que persistem por toda a vida do animal, sendo responsáveis pela maturação e diferenciação dos linfócitos B (TIZARD, 2008).

As PP ileocecais, assim como o timo, são maiores em animais muito jovens e envolvem a partir de um ano de idade, apresentando trânsito de linfócitos baixo e população de células B dez vezes maior que a de células T. Em contrapartida, as PP jejunais persistem por toda a vida com uma movimentação de linfócitos relativamente alta e com número de células B e T equivalentes. Ambas PP têm como função a proliferação rápida de células B, porém há diferenças funcionais entre as duas. (TIZARD, 2008).

As glândulas linfoepiteliais, localizadas no intestino grosso e ceco de suínos, são glândulas agregadas que circundam as glândulas intestinais alongadas e contém muitas células plasmáticas, sugerindo ser o maior sítio de produção de anticorpos. Nesse contexto, as placas de Peyer e as glândulas linfoepiteliais constituem o GALT organizado (*Gut-associated Lymphoid Tissue*), enquanto que o GALT difuso é composto pela lâmina própria e linfócitos intraepiteliais (GUEDES & FRANÇA, 2007; TIZARD, 2008).

O GALT constitui-se de monocamada de células epiteliais da mucosa que protege o organismo contra antígenos externos, mantendo-os no lúmen intestinal, além de promover tolerância imunológica contra antígenos presentes nos alimentos. O GALT organizado é o sítio indutor que promove a proliferação de linfócitos, principalmente de linfócitos B, os quais após sofrerem maturação juntamente com os linfócitos T migram para a lâmina própria juntando-se a um grande grupo celular diverso constituído por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e outras células. Os linfócitos intraepiteliais são um grupo celular homogêneo de populações de células T  $CD_8^+$  ou de  $CD_4^+CD_8^-$ , podendo ser diferenciados pelos receptores  $\gamma$  e  $\delta$  (GUEDES & FRANÇA, 2007).

Os órgãos linfóides secundários surgem tardiamente na vida fetal, persistindo por toda a vida do animal. São eles os linfonodos, as tonsilas, o baço, a medula óssea e os tecidos linfóides espalhados por todo o corpo, particularmente nos tratos digestório, respiratório e urogenital. Os linfonodos dos suínos são classificados como

“invertido”, pois os nódulos agregados estão orientados de forma que o córtex de cada nódulo se localize em direção ao centro, enquanto a medula localiza-se na periferia (WOOD, 2006).

Os linfócitos T circulantes são escassos na linfa suína, em razão de deixarem os linfonodos pela corrente sanguínea, através das vênulas do endotélio alto do paracórtex e, não pelos vasos linfáticos. Em geral, os linfonodos consistem de rede composta por linfócitos, macrófagos e células dendríticas. Os linfócitos B predominam no córtex, enquanto que os linfócitos T no paracórtex. Já na medula encontram-se também linfócitos B, macrófagos, reticulócitos e plasmócitos (TIZARD, 2008).

As tonsilas suínas estão localizadas no palato. Seu epitélio e criptas são constituídos por linfócitos B e T. Alguns linfócitos provenientes da corrente sanguínea e da linfa intestinal também recirculam pelo corpo através das tonsilas (ROTHKÖTTER, 2009).

O baço em suínos está completamente formado aos 36 dias de gestação. É dividido em polpa vermelha (onde há o armazenamento de eritrócitos e captura de antígenos) e, em polpa branca, rica em linfócitos (SINKORA & BUTLER, 2009; ROTHKÖTTER, 2009).

A medula óssea é um órgão hematopoiético cuja atividade nos suínos aumenta a partir dos 45 dias de gestação até o nascimento. Além disso, origina todas as células sanguíneas, assim como os precursores dos macrófagos, células dendríticas e linfócitos (SINKORA & BUTLER, 2009).

### **3. Imunonutrientes na nutrição de leitões**

Em situações associadas ao estresse, os animais tornam-se susceptíveis às infecções causadas por microrganismos patogênicos. Desse modo, melhorar a função imune, adotando estratégias nutricionais, pode auxiliar na manutenção ou restauração da resposta imune (XAVIER et al., 2006).

A imunonutrição é definida como o potencial de modular a atividade imunológica através da intervenção com nutrientes específicos em quantidades adequadas, objetivando com tal estratégia, alterar o fornecimento de nutrientes, visando modificar a resposta inflamatória e imunológica, melhorando a resistência e resiliência do animal (HANNAS, 2010).

A ação protetora do sistema imunológico tem um custo nutricional, uma vez que em situações de maior desafio sanitário, alguns nutrientes são redirecionados do



crescimento para auxiliar a resposta imune no combate ao agente patogênico (RIBEIRO et al., 2008).

Em situações de estresse, ocorre maior síntese e secreção de esteróides e corticosteróides que afetam o estado imunológico, resultando em menor resistência às infecções, aumento do catabolismo e interferência na utilização de nutrientes e síntese de tecidos. Essas alterações aumentam a taxa metabólica basal e a utilização de carboidratos e, subseqüentemente, a exigência de energia. A glicose é desviada para tecidos periféricos e tecidos responsáveis pela resposta imunológica, conseqüentemente, as taxas de crescimento dos tecidos e a síntese de proteína corporal são reduzidas. Além disso, proteínas corporais são catabolizadas, contribuindo para a síntese de proteínas de fase aguda ou de outros produtos imunológicos (CARGILL & BANHAZI, 1998).

Os efeitos dos principais nutrientes com ação imunológica estão descritos a seguir. Ressalta-se que esses efeitos sofrem influência da idade, condição sanitária, fase de produção e condição nutricional do animal.

### **3.1 Minerais e vitaminas**

São antioxidantes não enzimáticos, representados pelos oligoelementos (Fe, Zn e Se) e vitaminas (E, A e C) reconhecidos pelo seu papel na fagocitose, síntese de moléculas como as leucinas e imunoglobulinas e na atividade dos órgãos linfóides (SURAI, 2005).

O ferro está envolvido em diversas reações químicas relacionadas aos processos de obtenção de energia e multiplicação celular em praticamente todas as células animais. Em quadros de deficiência desse mineral, há redução da atividade fagocítica dos neutrófilos e macrófagos, provavelmente devido à baixa atividade da mieloperoxidase, redução da diferenciação, proliferação e número de linfócitos T e falhas na atividade das células *natural killer* (RIBEIRO et al., 2008).

O zinco é o segundo elemento traço de maior abundância em mamíferos, integrando a composição de mais de 300 enzimas (SURAI, 2005). Atua no estímulo à atividade de linfócitos T auxiliares, desenvolvimento dos linfócitos T citotóxicos, produção de citocinas e apoptose de células de linhagens mielóide e linfóide. Sua carência afeta a atividade dos órgãos linfóides, resultando em alterações na síntese de linfócitos e alterações epidérmicas associadas à maior penetração de patógenos. Outros estudos mostraram que o zinco, administrado na forma de ZnO, foi capaz de inibir a adesão de *Escherichia coli* nos enterócitos, aumentar a expressão de IGF-1

nas células do intestino delgado e o comprimento das vilosidades intestinais (SURAI, 2005; LI et al., 2006).

O selênio é um micronutriente de ação antioxidante que influencia a atividade da enzima glutathiona peroxidase, atuando na remoção dos lipídeos hidroperoxidados tóxicos e dos radicais livres, estimula o sistema imunológico e intervém no funcionamento da glândula tireóide. Seu déficit acarreta a redução da resistência às infecções virais e microbianas, ação dos anticorpos (IgG, IgM e IgA), desenvolvimento dos linfócitos e quimiotaxia dos neutrófilos (ARTHUR et al., 2003).

A vitamina E, conhecida pelo efeito antioxidante, atua na manutenção da integridade estrutural das células, incluindo as células imunes, no estímulo à atividade de macrófagos e linfócitos B e T, na prevenção de danos de radicais livres e produtos de peroxidação aos tecidos, na redução dos níveis plasmáticos de cortisol e PGF-2, beneficiando os animais submetidos ao estresse. Em casos de deficiência dessa vitamina ocorreu supressão da atividade dos linfócitos B e T, produção de imunoglobulinas, síntese de citocinas e linfocinas (RIBEIRO et al., 2008).

A vitamina A desempenha várias funções, sendo importante para a visão, expressão gênica, reprodução, desenvolvimento embrionário, diferenciação tissular, integridade das mucosas, ação antioxidante e função imunológica. A vitamina A modula a resposta das células fagocíticas e ativa a citotoxicidade mediada por células. Sua deficiência está associada ao aumento da susceptibilidade às infecções, em razão da menor atividade das células *natural killer* e macrófagos, da síntese de interferons, proliferação de linfócitos, bem como da redução do tamanho do timo e baço (SARNI et al., 2010).

A vitamina C atua como potente antioxidante e tem ação em diversas reações bioquímicas celulares, como na hidroxilação do colágeno, garantindo a resistência dos ossos, dentes, tendões e parede dos vasos sanguíneos; síntese e catabolismo da tirosina e de neurotransmissores; estímulo à atividade leucocitária e à síntese de interferons (HANNAS, 2010; SARNI et al., 2010).

### **3.2 Aminoácidos**

A maior parte dos mediadores inflamatórios são peptídeos, a exemplo das citocinas, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento. Essa exigência específica de aminoácidos para a resposta imune confere um papel chave para o nível e qualidade de proteínas na dieta, a fim de suprir as necessidades imunológicas sem afetar negativamente o desempenho animal (HANNAS, 2010).

A arginina é um aminoácido não essencial e, em condições fisiológicas tem importante papel para a síntese protéica. É precursora na síntese de uréia, ornitina, poliaminas e de óxido nítrico. Em situações de trauma, estresse metabólico ou jejum prolongado, a arginina torna-se um aminoácido essencial (SATRIANO, 2004). Esse aminoácido tem sido relacionado ao aumento da imunidade, que parece ter correlação com a maior liberação de hormônio do crescimento (CURLEY et al., 2003). Esse aumento da atividade do sistema imune é decorrente do aumento da produção de hidroxiprolina e da atividade dos linfócitos T, células *natural killer* e macrófagos (MÉIER et al., 2004).

A glutamina, aminoácido neutro e gliconeogênico, sintetizado por mecanismos endógenos, a partir da amônia e glutamato é o mais abundante aminoácido do organismo. É sintetizada por diversos tecidos, sendo encontrada em maior quantidade no sangue e músculo esquelético. É considerado um aminoácido condicionalmente essencial, pois em quadros de hipercatabolismo decorrentes de traumas, infecções graves e câncer, onde há elevação das taxas de degradação muscular, ocorre o aumento de sua demanda pelos tecidos, resultando em redução significativa dos seus níveis plasmáticos (ALBERTINI & RUIZ, 2001; LI et al., 2007).

A glutamina é o mais importante substrato de energia para células em divisão rápida, como os enterócitos, linfócitos, neutrófilos, macrófagos e células renais. Atua no estímulo à proliferação de linfócitos T, fornece ATP para o *turnover* protéico intracelular, sendo o combustível celular mais importante para a produção das citocinas, ativação de macrófagos, inibição da apoptose, transporte de nutrientes através da membrana plasmática, crescimento, migração e manutenção da integridade celular (HANNAS, 2010). Ainda atua na prevenção da atrofia intestinal, mantém os níveis de IgA secretados pelo intestino, garantindo a proteção da mucosa intestinal (WAITZBERG et al., 2000).

O triptofano, aminoácido essencial para deposição protéica, também é precursor de metabólitos como a grelina, serotonina, ácido nicotínico e melatonina. É importante intermediário do sistema imune e sua utilização aumenta durante processos inflamatórios. Os motivos para seu catabolismo residem na indução de sua utilização pelas citocinas, em especial, o interferon e, em seu uso pelo fígado para a gluconeogênese e síntese de proteínas de fase aguda (WU, 2010).

A treonina, além de ser utilizada para síntese de proteínas do tecido muscular e do leite, também está envolvida em outras funções fisiológicas, como na digestão e na ativação do sistema imune. As secreções digestórias, dentre elas o muco, é composto

principalmente de água (95%) e mucinas (5%), que são glicoproteínas de alto peso molecular ricas em treonina. Similarmente às mucinas, os anticorpos são glicoproteínas globulares que contêm elevados níveis de treonina, tornando-se o primeiro aminoácido limitante para a produção de imunoglobulinas G (AJINOMOTO, 2003).

### 3.3 Lipídeos

A quantidade e tipo de lipídeos podem modular as funções imunes. Nesse aspecto, o adequado balanço da ingestão de ácidos graxos, especialmente os da família ômega 3 – n3 (ácido linolênico) e ômega 6 – n6 (ácido linoléico e araquidônico) são importantes nessa imunomodulação e na severidade do processo inflamatório. O metabolismo desses ácidos graxos é competitivo, pois a elongação ou dessaturação de suas cadeias carbônicas utilizam o mesmo conjunto de enzimas (RIBEIRO et al., 2008; HANNAS, 2010).

Os ácidos graxos n-3 apresentam dois derivados importantes (EPA - ácido eicosapentaenóico e DHA - ácido docosahexaenóico), constituintes dos fosfolipídeos das membranas das células que, além de modularem a função celular atuando como mediadores intracelulares da transdução de sinais e moduladores das interações entre células, também inibem a atividade do fator nuclear  $X_B$  (NF- $X_B$ ). Fator esse, responsável por induzir a expressão de vários genes de moléculas pró-inflamatórias, como algumas citocinas e moléculas de adesão (ANDRADE & CARMO, 2006; MAHAN et al., 2013).

O ácido araquidônico induz a produção de eicosanóides pró-inflamatórios (LT4 e PGE-2) de ação supressora, os quais inibem a proliferação de linfócitos, produção de anticorpos e citocinas, expressão de moléculas de adesão e ativação das células *natural killer*. Nesse aspecto, o metabolismo do EPA contrabalança esse efeito negativo sintetizando leucotrienos biologicamente menos ativos (LT5 e PGE-3), de ação anti-inflamatória (PERINI et al., 2010).

O ácido linoléico conjugado (CLA), exerce efeitos sobre o sistema imune no que se refere ao estímulo para síntese de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), linfócitos T citotóxicos e na redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ . (HANNAS, 2010).

#### 4. Densidade nutricional das dietas

As doenças infecciosas e reações inflamatórias marcadamente reduzem o consumo de ração e redistribuem os nutrientes necessários ao crescimento, os quais agem no suporte aos mecanismos de ativação do sistema imunológico (WANNEMACHER, 1977; JOHNSON, 1997).

Nas primeiras semanas pós-desmame, a ingestão energética do leitão é de apenas 60 a 70% de sua necessidade normal de energia metabolizável. O déficit se acentua com a ativação imunológica decorrente de desafios sanitários e estresse, aos quais o leitão é submetido (LE DIVIDICH & SÈVE, 2000).

Como o mais evidente efeito do estresse imunológico para o crescimento é a queda no consumo de alimento, torna-se prudente manipular a densidade energética da ração (KLASING, 1992) mantendo-se a relação energia:nutrientes com intuito de melhorar o desempenho animal.

A fonte calórica usada para ajustar a densidade energética da dieta é muito importante. A suplementação de lipídeos à dieta de desmame e crescimento de leitões é comumente empregada para aumentar a densidade energética (STAHLY, 1984), podendo contribuir para a redução do impacto provocado pela reação inflamatória no animal, todavia, os resultados encontrados são contraditórios. A adição de lipídeos em dietas de leitões desmamados melhorou o ganho médio de peso e a eficiência alimentar, principalmente a partir das primeiras duas semanas do período de creche (CERA et al., 1990; HOWARD et al., 1990; LI et al., 1990; JONES et al., 1992).

A resposta inflamatória associada ao desafio imunológico aumentou a temperatura corporal e a taxa metabólica, sugerindo aumento na necessidade de energia pelo animal e de ácidos graxos pelos tecidos (BARACOS et al., 1987; JOHNSON, 1997).

Van Heugten et al. (1996), ao fornecerem dietas com alto ou baixo teor de energia, via amido ou gordura, verificaram que o aumento da densidade energética da dieta não alterou o desempenho dos leitões desafiados com 200 µg kg<sup>-1</sup> de PV (peso vivo) de LPS (lipopolissacarídeo) de *Escherichia coli* 055:B5 aos 30 e 46 dias de idade e deprimiu a resposta humoral (resposta mediada por anticorpos).

#### 5. Beta-glucanos

A composição da dieta influencia o funcionamento do sistema imune. Nesse sentido, mudanças na composição da dieta são tidas como ferramentas para melhorar a função imunológica. Dessa maneira, os beta-glucanos presentes em diversos

alimentos, como cereais e cogumelos, estão frequentemente sob investigação por esse propósito (VOLMAN et al., 2008).

A investigação sobre os beta-glucanos teve início durante as décadas de 60 e 70, sob duas vertentes em sua história: a linha euro-americana e a linha japonesa. As pesquisas euro-americanas basearam-se no estudo dos efeitos imunomoduladores do *zymosan*, mistura de polissacarídeos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, primeiramente preparado e estudado por Pillemer & Ecker (1941), devido ao potencial estimulador da atividade de macrófagos e da liberação de citocinas pelos neutrófilos. Após ensaios detalhados, descobriu-se que o componente do *zymosan* responsável por tais efeitos eram os beta-glucanos, os quais, posteriormente foram isolados, purificados e tiveram seus efeitos imunológicos estudados. Já, a linha japonesa, em razão do tradicional consumo medicinal de cogumelos, estudou os efeitos biológicos dos mesmos, o que resultou na descoberta de que tais efeitos eram também causados pelos beta-glucanos (VETVICKA, 2011).

Os beta-glucanos são polissacarídeos constituídos por monômeros de glicose ligados entre si por meio de ligações  $\beta$ -glicosídicas. São os principais componentes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e algumas bactérias. Os cereais, como cevada e a aveia também contêm beta-glucanos como parte das células da parede celular de seu endosperma (VOLMAN et al., 2008).

Dependendo da fonte, existem claras diferenças na estrutura macromolecular dos beta-glucanos. Os beta-glucanos de leveduras e fungos consistem de monômeros de glicose com ligações  $\beta$ -1,3 ligados a pequenos resíduos ramificados constituídos por ligações  $\beta$ -1,6 (VOLMAN et al., 2008).

Em contraste, os beta-glucanos das paredes celulares de cereais como a aveia e a cevada são formados por monômeros de glicose de ligações  $\beta$ -1,4 ligados de forma linear, mas alternados aos monômeros de glicose constituídos por ligações  $\beta$ -1,3, enquanto que os beta-glucanos de origem bacteriana somente apresentam ligações  $\beta$ -1,3 lineares entre seus monômeros (ESTRADA et al., 1997; BROWN & GORDON, 2003; BROWN et al., 2003).

Além de diferenças no tipo de ligação e ramificações, os beta-glucanos podem variar conforme sua massa molecular, solubilidade, viscosidade, estrutura terciária (tridimensional), grau de ramificação, tipo de carga do polímero e tipo de conformação, o que pode influenciar seus efeitos imunomoduladores (WILLIAMSON et al., 1992).

Brown & Gordon (2003), sugeriram que polímeros de beta-glucanos com alto peso molecular provenientes de fungos ativaram diretamente os leucócitos, enquanto

que os mesmos beta-glucanos que apresentaram baixo peso molecular só modularam a resposta das células, quando estas foram estimuladas por citocinas.

Com relação às características dos beta-glucanos, deve-se salientar que o método de isolamento pode influenciar sua característica imunomoduladora. Conseqüentemente, diferenças de respostas podem ser esperadas entre vários beta-glucanos, diferenciadamente isolados da mesma fonte (BROWN & GORDON, 2003; VOLMAN et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que os beta-glucanos de leveduras e fungos são capazes de melhorar a responsividade e a função das células imunológicas, pois aumentam os mecanismos inespecíficos de defesa nos animais. Os beta-glucanos estimulam os órgãos linfóides primários e secundários, potencializam a atividade dos macrófagos e ativam a função antimicrobiana de células mononucleares (WILLIAMS, 1997; TZIANABOS, 2000; GUO et al., 2003; ZEKOVIC et al., 2005). Esta melhoria na resposta imunológica é acompanhada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (ADACHI et al., 1994; OLSON et al., 1996; YOUNG et al., 2001), do *respiratory burst* e da produção de quimiocinas (WILLIAMS, 1997).

Com a adição *in vitro* de lipopolissacarídeo (LPS), em presença de beta-glucanos de diferentes origens (levedura, fungos e cereais), foi verificado crescente aumento nas concentrações do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e das interleucinas IL-8 e IL-10 (ENGSTAD et al., 2002; VOLMAN et al., 2008).

Ensaio clínico demonstraram que os beta-glucanos nas posições de ligação  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 originários de leveduras são mais eficazes na ativação do sistema imune e que os macrófagos apresentaram receptores específicos para as moléculas de beta-glucanos, os quais também foram encontrados em neutrófilos e células NK (VETVICKA et al., 1997; COUSO et al., 2001; JUUL-MADSEN et al., 2010).

A suplementação de beta-glucanos também modulou a resposta imune das células das placas de Peyer e dos linfócitos intestinais intra-epiteliais. Os efeitos protetores dessa suplementação com beta-glucanos foram decorrentes das interações mediadas por receptores com as células M (células epiteliais especializadas no transporte de macromoléculas para as placas de Peyer), que promoveram o aumento da produção de citocinas e melhoraram a resistência às infecções (SUZUKI et al., 1990; TSUKADA et al., 2003).

## 5.1 Ações e efeitos em reações imunológicas

As células M do trato gastrointestinal e os macrófagos das placas de Peyer ligam-se aos beta-glucanos solúveis ou aos seus particulados e, subsequentemente os fagocitam, independentemente de seu tamanho. Após a interiorização do beta-glucano, um processo lento de degradação ocorre, resultando na fragmentação em partículas cada vez menores. Estes fragmentos são constantemente liberados e se ligam aos macrófagos ou às células equipadas com receptores específicos que circulam por todo o corpo e que liberam estes fragmentos nos diferentes órgãos (VETVICKA et al., 1997; NOVAK & VETVICKA, 2008).

Estudos conduzidos por pesquisadores da Universidade de Louisville (USA) com beta-glucano marcado revelaram que, após três dias de administração oral, fragmentos encontrados no interior de macrófagos esplênicos eram do mesmo tamanho que o material original. E estes fragmentos encontravam-se de forma concentrada e agregada em suas bordas citoplasmáticas (VETVICKA et al., 1997).

Estudos que utilizaram linhas celulares selecionadas de macrófagos mostraram liberação lenta (por treze dias), mas frequente de fragmentos de beta-glucano biologicamente ativo no meio citoplasmático dessas células após sua completa fagocitose (VETVICKA et al., 1997; HONG et al., 2004).

Os efeitos dos beta-glucanos em reações imunes estão bem estabelecidos por este ser estimulador da imunidade celular. Os dois receptores principais de beta-glucanos são o CR<sub>3</sub> e a dectina-1. O receptor CR<sub>3</sub> é um receptor de membrana celular do sistema complemento, criado para o reconhecimento de polissacarídeos e de patógenos, através de vias não mediadas por anticorpos (VETVICKA et al., 1997; VETVICKA, 2011).

Quando um iC<sub>3b</sub> (fragmento produto da clivagem proteolítica do complexo 3 do sistema complemento) é reconhecido pelos receptores CR<sub>3</sub> das células fagocíticas e NK, ocorre a opsonização dos beta-glucanos, resultando na ativação dos processos de fagocitose e degranulação citotóxica, mecanismos esses importantes para a defesa do organismo. A estimulação da degranulação citotóxica pelas células opsonizadas por iC<sub>3b</sub> requer a presença de polissacarídeos específicos que são reconhecidos por domínio de lectina contido dentro do CR<sub>3</sub> e que mapeia uma região distinta do seu sítio de ligação com o iC<sub>3b</sub> (VETVICKA et al., 1997).

Esse modo de ação representa uma forma de reconhecimento de padrões inatos de defesa que permitem a discriminação entre certos microrganismos e células do hospedeiro. A principal conclusão baseia-se no fato dos polissacarídeos solúveis



dos beta-glucanos isolados de leveduras ou fungos poderem se ligar ao domínio de lectinas contidos no CR<sub>3</sub> e preparar o receptor para degranulação citotóxica em resposta aos tumores que eram normalmente resistentes a esta forma de citotoxicidade celular (VETVICKA et al., 1997; ROSS et al., 1999; VETVICKA, 2011).

A dectina-1 é o receptor localizado na superfície de macrófagos e tem envolvimento especial na detecção e fagocitose de fungos. Em certos casos, associam-se à TLR-2 (receptor de reconhecimento padrão), uma proteína transmembrana que promove a ligação a um PAMP fúngico (padrão molecular associado ao patógeno), ocasionando a morte de células invasoras e induzindo a produção de citocinas e quimiocinas. Essas respostas celulares são mediadas pela dectina-1 por transdução de sinal dos imunorreceptores do tipo ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes em sua cauda citoplasmática (VETVICKA et al., 1997; BROWN et al., 2002; VETVICKA, 2011).

Os beta-glucanos também desencadeiam processos intracelulares, caracterizados pela explosão respiratória (*respiratory burst*) após a fagocitose de células invasoras que resultam na formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radical superóxido, NO, HClO) e no aumento do conteúdo e atividade de enzimas hidrolíticas e processos de sinalização que conduzem à ativação de outros fagócitos e secreção de citocinas capazes de iniciar reações inflamatórias (como as interleucinas IL-1, IL-9 e TNF- $\alpha$ ). Os efeitos mais acentuados consistem no aumento da atividade fagocítica de granulócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (VETVICKA et al., 1997; VETVICKA, 2011).

## 6. Objetivos

Considerando o exposto, o presente trabalho avaliou os efeitos da adição de beta-glucanos, originários da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em dietas de diferentes densidades nutricionais fornecidas a leitões desmamados, desafiados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

As variáveis aferidas foram o desempenho, parâmetros bioquímicos, de resposta imunológica, peso de órgãos e morfométricos intestinais.

Assim, os trabalhos contidos respectivamente, nos capítulos 2 e 3 apresentam-se de acordo com as normas da revista ***Developmental & Comparative Immunology*** – ***Elsevier***.

## 7. Referências bibliográficas

- ADACHI, Y.; OKAZAKI, M.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)-β-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.17, n.12, p.1554–1560, 1994.
- ALBERTINI, S.M.; RUIZ, M.A. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia**, v.23, n.1, p.41-47, 2001.
- ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Metabólica**, v.8, n.3, p.135-143, 2006.
- ARTHUR, J.R. MCKENZIE, R.C.; BECKETT, G.J. Selenium in the immune system. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1457S-1459S, 2003.
- AJINOMOTO – **Boletim Técnico** 10. Exigências de treonina para suínos. Benefícios da suplementação de L-treonina. 2003. Disponível em: [www.lisina.com.br](http://www.lisina.com.br). Acesso em 15 de dezembro de 2011.
- BARACOS, V.E.; WHITMORE, W.T.; GALE, R. The metabolic cost of fever. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.65, n.2, p.1248-1254, 1987.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; ALMEIDA, M.N. Programas de vacinação para diferentes sistemas de produção. In: XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES, 2007. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. p.54-67.
- BLECHA, F.; POLLMANN, D.S.; NICHOLS, D.A. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. **Journal of Animal Science**, v.56, n.2, p.396-400, 1983.
- BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v.19, p.311–315, 2003.
- BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.J.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of β-glucans. **The Journal of Experimental Medicine**, v.197, n.9, p.1119-1124, 2003.
- BROWN, H.; SPEER, V.C.; QUINN, L.Y.; HAYS, V.M.; CATRON, D.V. Studies on colostrum-acquired immunity and active antibody production in baby pigs. **Journal of Animal Science**, v.20, p.323-328, 1961.
- BROWN, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S.Y.C.; GORDON, S. Dectin-1 is a major β-glucan receptor on macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v.196, n.3, p.407–412, 2002.

- CARGILL, C.; BANHAZI, T. The importance of cleaning in all in/all out management systems. In: 15th IPVS Congress, 1998. **Proceedings...** Birmingham: England, 1998. p.15.
- CERA, K.R.; MAHAN, D.C.; REINHART, G.A. Evaluation of various extracted vegetable oils, roasted soybeans, medium-chain triglyceride and an animal-vegetable fat blend for postweaning swine. **Journal of Animal Science**, v.68, n.9, p.2756-2765, 1990.
- COLDITZ, I.G. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. **Livestock Production Science**, v.75, n.3, p.257–268, 2002.
- COUSO, N.; CASTRO, R.; NOYA, M.; OBACH, A.; LAMAS, J. Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, n.7, p.607-618, 2001.
- CURLEY, S.A.; BOMALASKI, J.S.; ENSOR, C.M.; HOLTSBERG, F.W.; CLARK, M.A. Regression of hepatocellular cancer in a patient treated with arginine deiminase. **Hepatogastroenterology**, v.50, p.1214-1216, 2003.
- DE LEO, F.R.; ALLEN, L.H.; APICELLA, M.; NAUSEEF, W.M. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. **The Journal of Immunology**, v.163, n.12, p.6732-6740, 1999.
- EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molecular Aspects of Medicine**, v.19, p.221-357, 1998.
- ENGLISH, P.R. Improving piglet survival, growth to weaning and post weaning performance. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 3., 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1998. p.17-36.
- ENGSTAD, C.S.; ENGSTAD, R.E.; OLSEN, J.O.; OSTERUD, B. The effect of soluble  $\beta$ -1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. **International Immunopharmacology**, v.2, n.11, p.1585-1597, 2002.
- ESTRADA, A.; YUN, C.H.; VAN KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S.; LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat  $\beta$ -glucan in vitro and in vivo. **Microbiology and Immunology**, v.41, n.12, p.991–998, 1997.
- FERREIRA, R.A.; SOUSA, R.V. O desenvolvimento do sistema imune de leitões e suas correlações com as práticas de manejo. **Boletim Agropecuário**, v.39, p.1-39, 2002.

- FORT, M. Atualidades no Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2). **Revista Suínos & Cia**, Campinas: Administração, Redação e Publicação, v.35, p.26-39, 2010.
- GASKINS, H.R. Immunological development and mucosal defense the pig intestine. In: WISEMAN, J.; VARLEY, M.A.; CHADWICK, J.P. **Progress in pig science**. Nottingham University Press, 1998. p.81-102.
- GERNER, W.; KÄSER, T.; SAALMÜLLER, A. Porcine T lymphocytes and NK cells - An update. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, n.3, p.310-320, 2009.
- GRAÑA, G.L. **Plasma sanguíneo em substituição ao leite desnatado em dietas sem antibióticos para leitões desmamados aos 21 dias de idade**. 2007. 40f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- GUEDES, R.M.C; FRANÇA, S.A. Imunologia do trato digestivo de suínos. In: XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES, 2007, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. p.44-53.
- GUO, Y.M.; ALI, R.A.; QURESHI, M.A. The influence of  $\beta$ -glucan on immune responses in broiler chicks. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.25, n.3, p.461-472, 2003.
- HANNAS, M.I. Imunonutrição em suínos: fundamentos, conceitos e imunonutrientes. In: IV Congresso Latino Americano de Nutrição Animal, 2010, São Pedro. **Anais...IV CLANA**, São Pedro, 2010. p.135-148.
- HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.4, p.345-375, 1990.
- HONG, F.; YAN, J.; BARAN, J.T.; ALLENDORF, D.J.; HANSEN, R.D.; OSTROFF, G.R.; XING, P.X.; CHEUNG, N.V.; ROSS, G.D. Mechanism by which orally administered  $\beta$ -1,3-glucans enhances the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **The Journal of Immunology**, v.173, n.2, p.797-806, 2004.
- HOWARD, K.A.; FORSYTH, D.M.; CLINE, T.R. The effect of an adaptation period to soybean oil additions in the diets of young pigs. **Journal of Animal Science**, v.68, n.3, p.678-683, 1990.
- HURLEY, D.J. Neonatal immune development in swine management. In: Annual Meeting Seminar of the American Association of Swine Veterinarians, **Proceedings...** 2004.
- JOHNSON, R.W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1244–1255, 1997.

- JOHNSON, R.W.; ESCOBAR J.; WEBEL, D.M. Nutrition and Immunology of Swine. In: Lewis A.J. & Southern L.L. **Swine Nutrition**. 2<sup>nd</sup> ed. Nebraska: CRC Press, 2001. p.545-562.
- JONES, D.B.; HANCOCK, J.D.; HARMON, D.L.; WALKER, C.E. Effects of exogenous emulsifiers and fat sources on nutrient digestibility, serum lipids, and growth performance in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3473-3482, 1992.
- JUUL-MADSEN, H.R.; NORUP, L.; LAERKE, H.N. Modulation of the immune response of porcine neutrophils by different  $\beta$ -glucan preparations. **Livestock Science**, v.133, n.1, p.249-252, 2010.
- KLASING, K.C. Researchers detail link between nutrition and disease status. **Feedstuffs**, v.32, p.37-38, 1992.
- KUSHNER, I. C-reactive protein and the acute-phase response. **Hospital Practice**, v.25, p.13-28, 1990.
- LE DIVIDICH, J.; 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.
- LI, D.F.; THALER, R.C.; NELSEN, J.L.; HARMON, D.L.; ALLEE, G.L.; WEEDEN, T.L. Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology. **Journal of Animal Science**, v.68, n.11, p.3694-3704, 1990.
- LI, P.; YIN, Y.L.; LI, D.F.; KIM, S.W.; WU, G. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.237-252, 2007.
- LI, X.; YIN, J.; LI, D.; CHEN, X.; ZANG, J.; ZHOU, X. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-1 and IGF-1 receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.1786-1791, 2006.
- MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J.L. **KRAUSE: Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 13 ed. São Paulo: Roca, 2013.
- MÉIER, R.; STEUERWALD, M.; WAITZBERG, D.L. Imunonutrição em câncer. In: WAITZBERG, D.L. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.630-637.
- MILLER, B.; STOKES, C. The neonatal and postweaned pig. In: COLE, D.J.A.; WISEMAN, J.; NABUURS, M.J.A.; HOOGENDOORN, A.; VAN DER MOLEN, E.J. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. **Research Veterinary Science**, v.55, p.78-84, 1993.

- NOVAK, M.; VETVICKA, V.  $\beta$ -glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**, v.5, n.1, p.47-57, 2008.
- OSBORN, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell**, v.62, p.3-6, 1990.
- OLSON, E.J.; STANDING, J.E.; GRIEGO-HARPER, N.; HOFFMAN, O.A.; LIMPER, A.H. Fungal  $\beta$ -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. **Infection and Immunity**, v.64, n.9, p.3548–3554, 1996.
- PERINI, J.A.L.; STEVANATO, F.B.; SARGI, S.C.; VISENTAINER, J.E.L.; DALAILO, M.M.O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolism em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v.23, n.6, p.1075-1086, 2010.
- PIBOT, P.; BIOURGE, V.; ELLIOTT, D. Encyclopedia of Feline Clinical Nutrition. In: CAVE, N.J. **Nutrition and Immunity**. Royal Canin Group/Airmargues - France, 2008. p.479-506.
- PILLEMER, L.; ECKER, E.E. Anticomplementary factor in fresh yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v.137, p.139-142, 1941.
- PUPA, J.M.R.; HANNAS, M.I.; ALVARENGA E MELO, R.C. Nutrição, imunidade e reprodução. Revisão apresentada no **ENIPEC – Encontro Internacional dos Negócios Pecuários**. Campo Grande-MS, 2004. 23p.
- RIBEIRO, A.M.L.; PINHEIRO, C.C.; GIANFELICE, M. Nutrientes que afetam a imunidade dos leitões. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36 (Supl. 1), s119-s124, 2008.
- ROSS, G.D.; VETVICKA, V.; YAN, J.; XIA, Y.; VETVICKOVA, J. Therapeutic intervention with complement and  $\beta$ -glucan in cancer. **Immunopharmacology**, v.42, p.61-74, 1999.
- ROTHKÖTTER, H.J. Anatomical particularities of the porcine immune system - A physician's view. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, n.3, p.267-272, 2009.
- SARNI, R.O.S.; SOUZA, F.I.S.; COCCO, R.R., MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D. Micronutrientes e sistema imunológico. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.33, p.8-13, 2010.
- SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. **Amino Acids**, v.26, p.321-329, 2004.

- SINKORA, M.; BUTLER, J.E. The ontogeny of the porcine immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, n.3, p.273-283, 2009.
- STAHLY, T.S. Use of fats in diets for growing pigs. In: **Fats in Animal Nutrition**, J. Wiseman, London: Butterworth, 1984. p.313-331.
- STOKES, C.R.; BOURNE, J.F. Mucosal Immunity. In: HALLIWELL, R.E.W. (ed.) **Veterinary Clinical Immunology**. Hartcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, 1989. p.164-192.
- SURAI, P.F. **Minerals and antioxidants**. Re-defining mineral nutrition. Nottingham University Press, 2005. 295p.
- SUZUKI, I.; TANAKA, H.; KINOSHITA, A.; OIKAWA, S.; OSAWA, M.; YADOMAE, T. Effect of orally administered  $\beta$ -glucan on macrophage function in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v.12, n.6, p.675-684, 1990.
- THACKER, E.L. Part 2: Lymphocyte development and maturation. **The Pig Journal**, v.53, p.75-91, 2004.
- TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology: An introduction**. W.B. Elsevier: London, 2008. 476p.
- TSUKADA, C.; YOKOYAMA, H.; MIYAJI, C.; ISHIMOTO, Y.; KAWAMURA, H.; ABO, T. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of  $\beta$ -glucan. **Cellular Immunology**, v.221, n.1, p.1-5, 2003.
- TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.523-533, 2000.
- VAIMAN, M.; CHARDON, P.; ROTHSCHILD, M.F. Porcine major histocompatibility complex. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v.17, p.95-107, 1998.
- VAN HEUGHTEN, E.; COFFEY, M.T.; SPEARS, J.W. Effects of immune challenge, dietary energy density, and source of energy on performance and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.74, n.10, p.2431-2440, 1996.
- VARLEY, M.A. The Neonatal Pig Development and Survival. In: HERPIN, H.R.; KELLEY, K.W. **Immunology and Neonatal Mortality**. Guidford: CABI, 1995. p.39-55.
- VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, v.2, n.2, p.115-119, 2011.
- VETVICKA, V.; THORNTON, B.P.; WIEMAN, T.J.; ROSS, G.D. Targeting of natural killer cells to mammary carcinoma via naturally occurring tumor cell-bound iC3b and  $\beta$ -

- glucan-primed CR3 (CD11b/CD18). **The Journal of Immunology**, v.159, n.2, p.599-605, 1997.
- VOLMAN, J.J.; RAMAKERS, J.D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. **Physiology & Behaviour**, v.94, p.276-284, 2008.
- WAITZBERG, D.L.; LOTIERZO, P.H.P.; DUARTE, A.J.S.; SCHRONTS, E.P.; CERRA, F. Imunonutrição. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.1511-1538.
- WANNEMACHER, R.W. Key role of various individual amino acids in host response to infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.30, p.1269-1280, 1977.
- WILLIAMS, D.L. Overview of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v.6, p.247-250, 1997.
- WILLIAMSON, G.; DAMANI, K.; DEVENNEY, P.; FAULDS, C.B.; MORRIS, V.J.; STEVENS, B.J.H. Mechanism of action of cyclic  $\beta$ -1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: Competition between cyclization and elongation reactions. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.24, p.7941-7947, 1992.
- WOOD, P. **Understanding Immunology**. Pearson Education Limited: England, 2006. 315p.
- WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction and health. **Advances in Nutrition**, v.1, 31-37, 2010.
- XAVIER, E.G.; RUTZ, F.; ROLL, V.F.B. In: Imunonutrientes na produção de suínos. Anais I Simpósio UFRGS de Produção, Reprodução e Sanidade Suína, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2006. p.174-195.
- YOUNG, S.; YE, J.; FRAZER, D.G.; SHI, X.; CASTRANOVA, V. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glucan (Zymosan)-activated macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.20781-20787, 2001.
- ZEKOVIC, D.B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIC, M.M.; JAKOVLJEVIC, D.; MORAN, C.A. Natural and modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, p.205-230, 2005.



## **CAPÍTULO 2**

## **Efeito de beta-glucanos e da densidade nutricional da dieta sobre o desempenho, peso de órgãos e morfometria intestinal de leitões imunologicamente desafiados**

### RESUMO

A nutrição exerce influência na modulação do sistema imune e na melhoria da resistência dos animais à infecção, visto que os nutrientes são necessários para a multiplicação celular durante a resposta imune e síntese de moléculas relacionadas à comunicação celular. Dois experimentos foram conduzidos com leitões desmamados aos 21 dias de idade e submetidos ao desafio com  $150 \mu\text{g kg}^{-1}$  PV de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sorotipo 055:B5. Objetivou-se avaliar efeitos da adição de beta-glucanos originários da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (0 e 300 ppm) em dietas com densidade nutricional baixa e elevada (3300 e 3450 kcal de EM  $\text{kg}^{-1}$ ) sobre o desempenho (Experimento I) e morfometria intestinal (altura de vilosidades: AV, profundidade de criptas: PC, relação AV:PC e área das placas de Peyer: PP) e peso de órgãos (fígado, timo e baço) dos leitões (Experimento II). No experimento I foram utilizados 96 leitões em delineamento de blocos ao acaso (oito repetições), em esquema fatorial  $2 \times 2$  (2 níveis de beta-glucanos  $\times$  2 densidades nutricionais), enquanto no segundo experimento, 40 leitões foram distribuídos em delineamento de blocos ao acaso (cinco repetições) com arranjo fatorial dos tratamentos  $2 \times 2 \times 2$  (2 níveis de beta-glucanos  $\times$  2 densidades nutricionais  $\times$  2 épocas de abate: uma semana antes da primeira inoculação com LPS e uma semana após a segunda inoculação com LPS). Nos experimentos foram realizadas análises estatísticas dos dados utilizando o procedimento GLM (Experimento I) e análise multivariada (Experimento II) do SAS, sendo as médias comparadas pelo teste de Bonferroni  $P(<0,05)$ . A dieta de baixa densidade nutricional sem beta-glucanos proporcionou maior ( $P<0,05$ ) AV e AV:PC do duodeno e jejuno. Não foram observados efeitos ( $P>0,05$ ) dos beta-glucanos e da densidade nutricional da dieta no desempenho, PC do jejuno e na área das PP do íleo. A adição de beta-glucanos e o uso de dietas de alta densidade nutricional não se justificaram para leitões desmamados dos 21 aos 59 dias de idade, pois no presente estudo não foram encontrados efeitos dos tratamentos sobre o desempenho e substanciais efeitos no peso de órgãos e nas características morfométricas intestinais.

Palavras-chave: aditivos, imunomodulação, histologia

**Effect of beta-glucans and dietary nutrient density on growth performance, relative organs weight and intestinal morphometry of weanling pigs immunologically challenged**

ABSTRACT

Nutrition influences the modulation of the immune system and improves the resistance to infection, because the nutrients are required for cell proliferation during the immune response. Two experiments were conducted with piglets weaned at 21 days old and immunologically challenged with  $150 \mu\text{g kg}^{-1}$  BW lipopolysaccharide of *Escherichia coli* serotype 055:B5 to evaluate the effects of two levels of beta-glucans (0 and 300 ppm) of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and two levels of nutrient density (3300 and 3450 kcal ME  $\text{kg}^{-1}$ ) on growth performance (Experiment I) and intestinal morphometry (villus height: VH, crypt depth: CD, VH:CD, Peyer's patches area: PP) and organs weight (liver, spleen and thymus) of weanling pigs (Experiment II). In Experiment I, 96 weanling pigs were randomly assigned in a complete block design in a 2 x 2 factorial arrangement (2 levels of beta-glucans: 0 and 300 ppm, and 2 levels of nutrient density: 3300 and 3450 kcal ME  $\text{kg}^{-1}$ ) with 8 replications per treatment and 3 pigs per pen. In Experiment II, 40 weanling pigs were randomly assigned in a complete block design in a 2 x 2 x 2 factorial arrangement with the same levels of beta-glucans and nutrient density of experiment I at two slaughter moments with 5 replications per treatment and one pig per pen. Data were analyzed in accordance with GLM procedure (Experiment I) and multivariate procedure (Experiment II) by SAS, and the treatment means were compared by Bonferroni test ( $P < 0.05$ ) in both experiments. The low nutrient density diet without beta-glucans had higher ( $P < 0.05$ ) VH and VH:CD in duodenum and jejunum. No differences concerning levels of beta-glucans and nutrient density were observed ( $P > 0.05$ ) on growth performance, and CD in jejunum neither in PP ileal area. The addition of beta-glucans and high nutrient density diets are not viable for pigs from 21 to 59 days of age, once no effects were observed on growth performance neither on intestinal morphometry.

Keywords: additives, immunomodulation, stereology

## 1. Introdução

Ao desmame, os leitões são submetidos a diversos agentes estressores, como separação da porca, mudanças em sua alimentação e de ambiente, que contribuem para redução do crescimento. Associado a esses fatores, somam-se as marcantes alterações histológicas e bioquímicas no intestino, destacando-se a atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas, o que acarreta diminuição da capacidade digestiva e absorptiva do animal, contribuindo também para maior incidência de diarreias nessa fase de criação (Pluske et al., 1997).

Diversas estratégias nutricionais foram testadas na década passada com intuito de otimizar a transição associada ao desmame, minimizando a incidência de enterites, uma vez que a composição da dieta está intimamente relacionada às alterações na morfologia e secreção enzimática intestinais no pós-desmame (Pluske et al., 1997; Lallès et al., 2007). Desse modo, a integridade do epitélio intestinal torna-se de fundamental importância não somente para o desenvolvimento da capacidade digestória dos leitões, mas também por sua influência no sistema imune, atuando como barreira física à entrada de patógenos, bem como de componentes antigênicos de origem alimentar, favorecendo melhor desempenho e saúde dos leitões (Miguel, 2008).

Alternativas de ingredientes como os aditivos têm sido sugeridas nas dietas de suínos, visando superar esses problemas associados ao pós-desmame. Dentre eles, destacam-se os beta-glucanos, que têm ação na modulação do sistema imune melhorando a responsividade celular do sistema inespecífico de defesa, além de estimular os órgãos linfóides primários e secundários, potencializando a atividade dos macrófagos (Guo et al., 2003; Zekovic et al., 2005), contribuindo assim, para o fortalecimento do sistema imune em uma situação de maior desafio sanitário (Young et al., 2001).

A nutrição exerce influência na modulação do sistema imune e na melhoria da resistência dos animais à infecção, já que nutrientes são necessários para a síntese e regulação celular durante a resposta imune. Assim, o desafio sanitário aumenta a demanda por certos nutrientes que, ao invés de serem direcionados para o crescimento dos leitões são redirecionados para auxiliar a resposta do sistema imune do animal contra os agentes patogênicos (Le Dividich e Sevè, 2000; Johnson et al., 2001; Volman et al., 2008).

Considerando o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de níveis de beta-glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* e de densidade nutricional

das dietas fornecidas a leitões desmamados desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sobre o desempenho, pesos de órgãos e morfometria intestinal.

## **2. Material e Métodos**

Dois experimentos foram conduzidos no Setor de Suinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, câmpus de Botucatu. O primeiro para estudo de desempenho e o segundo, para avaliação do peso do fígado, baço e timo e para avaliação morfométrica dos segmentos do intestino delgado e das placas de Peyer da submucosa intestinal de leitões desmamados. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/UNESP/Botucatu, protocolo número 36/2011.

### **2.1 Experimento I**

#### **2.1.1 Animais e alojamento**

O experimento foi conduzido com 96 leitões (48 machos e 48 fêmeas) mestiços de genética comercial, desmamados aos 21 dias de idade e com peso médio de  $6,40 \pm 0,32$  kg, os quais foram alojados em um galpão de creche de alvenaria com pé direito de 3,5 m e com cortinas laterais, em baias metálicas suspensas, com área de  $1,70$  m<sup>2</sup>, equipadas com comedouro, bebedouro tipo chupeta e campânula com resistência elétrica, sendo a parte anterior do piso, sob o comedouro e a campânula, de concreto compacto e a parte posterior, composta por piso plástico. Sob as baias foi mantida lâmina d'água, que era substituída uma ou duas vezes por semana, dependendo do volume de dejetos produzidos.

#### **2.1.2 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 (dietas com dois níveis de beta-glucanos provenientes da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: ausente e 300 ppm e, duas densidades nutricionais baixa: 3300 kcal de EM kg<sup>-1</sup> e elevada: 3450 kcal de EM kg<sup>-1</sup>), com oito repetições por tratamento e três leitões por unidade experimental.

#### **2.1.3 Arraçoamento e composição das dietas**

Durante o período experimental, os animais receberam três tipos de dietas à vontade, de acordo com o sistema de arraçoamento por fases, dieta pré-inicial I nos primeiros 16 dias, dieta pré-inicial II dos 17 aos 28 dias e, inicial dos 29 aos 38 dias

pós-desmame (Tabelas 1 e 2). As dietas com densidade nutricional baixa (B) e elevada (A) foram formuladas para apresentarem 3300 e 3450 kcal de EM kg<sup>-1</sup>, respectivamente, e mesmas relações energia metabolizável:nutrientes recomendadas por Rostagno et al. (2011).

A fonte de beta-glucanos utilizada apresentava em sua composição 60% de beta-glucanos purificados com ramificações  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6 e foi adicionada às dietas em substituição a igual quantidade de material inerte (caulim).

**Tabela 1.** Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).

Ingredientes	Pré-inicial I		Pré-inicial II		Inicial	
	B	A	B	A	B	A
Milho	50,877	48,170	57,409	52,485	65,925	62,180
Farelo de soja	20,00	20,00	24,00	24,00	26,00	26,00
Sangue, hemácias	1,50	1,50	1,50	1,50	-	-
Açúcar	2,50	2,50	2,00	4,00	2,75	3,80
Leite em pó desnatado	6,00	6,00	3,00	3,00	-	-
Soro de leite	8,00	8,00	7,00	7,00	-	-
Maltodextrina	4,40	4,40	-	-	-	-
Óleo de soja	0,70	3,20	1,30	4,00	1,50	4,00
Farelo de glúten de milho (60%)	1,80	1,80	-	-	-	-
Caulim	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Calcário	0,74	0,75	0,83	0,84	0,82	0,82
Fosfato bicálcico	1,30	1,30	1,22	1,22	1,40	1,42
Cloreto de sódio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
L-Lisina.HCl (78%)	0,56	0,65	0,41	0,50	0,50	0,58
DL-Metionina (99%)	0,25	0,30	0,20	0,25	0,16	0,20
L-Treonina (98%)	0,23	0,28	0,16	0,22	0,17	0,22
L-Triptofano (98%)	0,053	0,062	0,027	0,035	0,026	0,036
Óxido de zinco (73%)	0,34	0,34	0,20	0,20	-	-
BHT <sup>1</sup>	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Edulcorante <sup>2</sup>	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Cloreto de colina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Premix mineral <sup>3</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico <sup>4</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> Butil-hidroxi-tolueno; <sup>2</sup> Sucran<sup>®</sup> (sacarina sódica); <sup>3</sup> Premix mineral fornecendo por kg de ração: 100 mg Fe, 10 mg Cu, 30 mg de Se, 40 mg Mn, 100 mg Zn, 1 mg Co, 1,5 mg I; <sup>4</sup> Premix vitamínico fornecendo por kg de ração: 9000 UI vit. A, 2250 UI vit. D<sub>3</sub>, 22,5 mg vit. E, 22,5 mg vit. K<sub>3</sub>, 2,03 mg vit. B<sub>1</sub>, 6 mg vit. B<sub>2</sub>, 3 mg vit. B<sub>6</sub>, 30 µg vit. B<sub>12</sub>, 0,9 mg ácido fólico, 14,03 mg ácido pantotênico, 30 mg niacina, 0,12 mg biotina, 400 mg de colina

**Tabela 2.** Valores nutricionais calculados das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).

Itens	Pré-inicial I		Pré-inicial II		Inicial	
	B	A	B	A	B	A
EM (kcal kg <sup>-1</sup> )	3300	3450	3300	3450	3300	3450
PB (%)	19,00	19,00	19,00	19,00	18,00	18,00
Lisina dig. (%)	1,41	1,47	1,30	1,36	1,17	1,22
Metionina dig. (%)	0,54	0,58	0,47	0,51	0,40	0,43
Treonina dig. (%)	0,89	0,92	0,82	0,86	0,74	0,77
Triptofano dig. (%)	0,25	0,26	0,23	0,24	0,21	0,21
Metionina + cisteína dig. (%)	0,79	0,83	0,73	0,76	0,65	0,68
Ca (%)	0,83	0,83	0,81	0,81	0,77	0,77
P dig. (%)	0,44	0,44	0,40	0,40	0,38	0,38
Lactose equivalente	10,00	10,00	5,00	5,00	0,00	0,00

#### 2.1.4 Inoculação de LPS

Os leitões receberam injeção intramuscular de 150 µg kg<sup>-1</sup> de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (SIGMA ALDRICH L2880, St. Louis, MO), dissolvidos em 1 mL de solução salina no 14° e no 28° dias do período experimental (35 e 49 dias de idade média dos leitões). Neste procedimento foram utilizadas agulhas hipodérmicas de 0,55 x 20 mm (24 G x ¾") acopladas às seringas de 5 mL. A dose de LPS foi baseada em estudos preliminares (Johnson e Borell, 1994; Van Heugten et al., 1994; Webel et al., 1997; Rakhshandeh e Lange, 2012).

#### 2.1.5 Avaliação do desempenho

O consumo médio diário de ração (CDR), ganho médio diário de peso (GDP) e a conversão alimentar (CA) dos leitões foram avaliados nos períodos de 0 a 16, 0 a 28 e de 0 a 38 dias do período experimental, com base nas pesagens dos leitões no início, aos 16, 28 e 38 dias do experimento, bem como da quantidade de ração fornecida e das sobras em cada período.

#### 2.1.6 Registro térmico no galpão de creche

As médias das temperaturas mínima e máxima diárias, referentes aos 38 dias de duração do experimento são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Registro das temperaturas máxima e mínima durante o experimento.

Fase experimental (dias)	Idade leitões (dias)	t mínima (°C)	t máxima (°C)
Pré- inicial I: 0 – 16	21 – 37	21,08 ± 1,793	25,35 ± 1,968
Pré-inicial II: 17 – 28	38 – 49	19,54 ± 2,103	24,93 ± 3,131
Inicial: 29 – 38	50 – 59	21,13 ± 2,758	29,68 ± 2,726

Além do monitoramento da temperatura diária, a observação do comportamento dos animais foi importante para orientar o manejo das cortinas e a altura das campânulas visando, independente da temperatura ambiente, manter o conforto térmico dos mesmos. O manejo das cortinas também foi fundamental para permitir a renovação de ar da sala, impedindo a incidência direta de correntes de ar frio sobre os leitões (Silva, 1999; Kummer et al., 2009).

### 2.1.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento PROC GLM (*General Linear Model*) do SAS (1999), sendo as médias comparadas pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

## 2.2 Experimento II

### 2.2.1 Alojamento, animais e arraçoamento

O experimento foi conduzido com 40 leitões (20 machos e 20 fêmeas) mestiços de genética comercial, desmamados aos 21 dias de idade, com peso médio de  $6,58 \pm 0,29$  kg, os quais foram alojados nas mesmas instalações experimentais e submetidos às mesmas práticas de manejo e arraçoamento do Experimento I.

### 2.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2$  (dois níveis de beta-glucanos provenientes da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas dietas: ausente e 300 ppm; duas densidades nutricionais das rações: baixa, com 3300 kcal de EM  $\text{kg}^{-1}$  e elevada, com 3450 kcal de EM  $\text{kg}^{-1}$  e, duas épocas de abate: uma semana antes da primeira inoculação com LPS e uma semana após a segunda inoculação com LPS), cinco repetições por tratamento e um leitão por unidade experimental, seguindo o mesmo protocolo experimental utilizado no experimento I (inoculação de LPS).



O produto comercial utilizado apresentava em sua composição 60% de beta-glucanos purificados com ramificações  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6 e foi adicionado às dietas em substituição a igual quantidade de material inerte (caulim).

### 2.2.3 Coleta e preparo das amostras

Após insensibilização elétrica, cinco leitões de cada tratamento foram abatidos para avaliações morfológicas da mucosa intestinal (porções distal do duodeno, anterior do jejuno e posterior do íleo) e pesagem do fígado, baço e timo. O peso vazio dos leitões foi calculado considerando o peso antes do abate e o peso da digesta presente no estômago e intestinos.

Porções de aproximadamente três centímetros do duodeno, jejuno e íleo foram coletadas, presas com auxílio de tachas de aço inoxidável número 12, em quadrado de isopor estéril e, subsequentemente lavadas com solução salina a 0,9%. Em seguida, esse material foi armazenado em copos coletores de plástico de 50 mL, fixados em 40 mL de solução de formol tamponado a 10% e, enviado após 48 h de imersão nessa solução, para processamento e confecção das lâminas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Para a confecção das lâminas, as amostras foram recortadas em fragmentos de um centímetro, armazenadas em cassetes histológicos e transferidas para suportes para sucessivas lavagens de desidratação em soluções alcoólicas de concentração crescente de 70% até álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol e transferidas para moldes para a fabricação dos blocos de parafina. Após o endurecimento dos mesmos, secções de 5  $\mu$ m de espessura de cada segmento coletado foram feitas utilizando micrótomo semi-automático rotativo Leica RM 2145, de modo que, entre um corte e o subsequente utilizado, cerca de doze cortes fossem desprezados. Imediatamente após o corte, as secções de parafina foram imersas em água morna para a retirada dos vincos e, posteriormente, transferidas para as lâminas de vidro para coloração com hematoxilina e eosina (HE).

Nas lâminas contendo as porções do duodeno e do jejuno foram realizadas 30 leituras da altura das vilosidades (AV) e profundidade das criptas (PC), utilizando o microscópio Leica DM 750 equipado com câmera ICC 50 para a captura e registro das imagens dos segmentos das vilosidades e o programa de análise de imagens - *Leica Application Suite Interactive Measurement* versão 3.5 para as medidas acima descritas. Em seguida, a partir dos resultados de AV e PC, a relação AV:PC foi determinada.

A ocorrência e aspecto das placas de Peyer foram avaliados nos cortes histológicos da submucosa do íleo corados com hematoxilina e eosina, segundo Behmer et al. (1976), adotando o mesmo procedimento anteriormente descrito para a confecção das lâminas e utilizando o mesmo microscópio para captura e registro das imagens das nodulações e o mesmo programa de análise de imagens para as medidas de área das mesmas.

#### **2.2.4 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes utilizando o procedimento *Profile Analysis* (Multivariate – SAS/IML) do SAS (1999), complementado com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Desempenho**

As médias das variáveis de desempenho: consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP) e conversão alimentar (CA) nos períodos de 0 a 16, 0 a 28 e de 0 a 38 dias do período experimental são apresentados na Tabela 4.

Não foram detectadas interações entre os níveis de beta-glucanos e densidade da dieta e não houve diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos para as variáveis analisadas durante os períodos avaliados, indicando que a adição de beta-glucanos e o uso de dietas de maior densidade nutricional não se justificaram para o período de 38 dias de avaliação de desempenho considerado.

Esses resultados corroboram aqueles verificados por Hwang et al. (2008) após 28 dias de avaliação de desempenho de leitões que receberam 400 ppm de beta-glucanos de *Paenibacillus polymyxa* na dieta e por Ledur et al. (2012) após 14 dias de avaliação de leitões submetidos a desafio com LPS de *Escherichia coli*, que receberam nível de 280 g ton<sup>-1</sup> de beta-glucanos na dieta.

Os resultados se assemelham também aos constatados por Dritz et al. (1995), quando trabalharam com leitões no período de sete a 35 dias pós-desmame, oferecendo dois níveis (0 e 1%) de 1,3-beta-glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta, por Mao et al. (2005) utilizando 1,3-1,6-beta-glucanos da erva chinesa *Astragalus membranaceus* e por Hahn et al. (2006), ao testar por 35 dias, quatro níveis de beta-glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* (0; 0,01%; 0,02%; 0,03% e 0,04%).

**Tabela 4.** Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre o desempenho de leitões.

Variável	Dietas <sup>1</sup>	Período (dias) <sup>2</sup>		
		0 a 16	0 a 28	0 a 38
<b>CDR<sup>3</sup></b> <b>(g)</b>	A0	379 ± 61	579 ± 61	640 ± 58
	Aβ	367 ± 46	574 ± 36	644 ± 53
	B0	365 ± 54	564 ± 66	633 ± 70
	Bβ	387 ± 60	594 ± 53	663 ± 66
<b>GDP</b> <b>(g)</b>	A0	271 ± 43	391 ± 37	398 ± 34
	Aβ	261 ± 38	396 ± 32	410 ± 36
	B0	260 ± 49	381 ± 50	390 ± 47
	Bβ	279 ± 45	402 ± 51	411 ± 62
<b>CA</b>	A0	1,40 ± 79	1,46 ± 72	1,59 ± 67
	Aβ	1,41 ± 92	1,44 ± 85	1,57 ± 83
	B0	1,42 ± 98	1,47 ± 66	1,61 ± 58
	Bβ	1,39 ± 60	1,46 ± 80	1,61 ± 125

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos

<sup>2</sup> Média ± desvio padrão (n=8); <sup>3</sup> médias comparadas pelo teste F (P<0,05)

Entretanto, Li et al. (2006) encontraram aumento de 12,7% no ganho de peso dos leitões suplementados com 50 ppm de beta-glucano e Eicher et al. (2006) suplementando 2,5% de 1,3-1,6-beta-glucanos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de leitões dos 21 aos 49 dias observaram maior ganho de peso no grupo que recebeu beta-glucanos, enquanto Mendes et al. (2010), trabalhando com leitões dos 21 aos 60 dias de idade, observaram maior ganho de peso dos leitões suplementados com 240 g ton<sup>-1</sup> de beta-glucanos na dieta em relação ao grupo controle.

A variação de resultados, encontrados no presente estudo em relação às outras pesquisas, quanto ao desempenho de leitões desmamados recebendo dietas com beta-glucanos pode ser atribuída às diferenças quanto à dosagem usada nos experimentos, duração do período experimental e, principalmente, em relação às fontes dos beta-glucanos utilizados.

Os beta-glucanos podem apresentar diferenças no tipo de ligação e ramificações e ainda, variar com relação à sua massa molecular, solubilidade,

viscosidade, estrutura terciária (tridimensional), grau de ramificação, tipo de carga do polímero e conformação, que influenciam seus efeitos imunomoduladores (Williamson et al., 1992). Além disso, o próprio método de extração pode determinar diferentes respostas entre os vários beta-glucanos diferenciadamente isolados da mesma fonte (Brown e Gordon, 2003; Volman et al., 2008).

### **3.2 Pesagem de órgãos e morfometria intestinal**

Os dados dos pesos absolutos (g) e relativos (% em relação ao peso corporal vazio) do fígado, baço e timo dos leitões são apresentados na Tabela 5 e, os dados morfométricos intestinais (AV: altura de vilosidades, PC: profundidade de criptas, relação AV:PC do duodeno e jejuno e área das placas de Peyer: PP do íleo) são apresentados na Tabela 6.

Verificou-se maior peso absoluto do fígado, baço e timo dos leitões abatidos aos 56 dias em comparação com os abatidos aos 28 dias. Esse comportamento é decorrente do crescimento dos animais, uma vez que o peso é variável em função das fases de crescimento e maturidade fisiológica do animal.

Além disso, constatou-se que na presença de beta-glucanos, os leitões abatidos aos 56 dias que consumiram a dieta de alta densidade nutricional apresentaram maior peso absoluto do fígado ( $P < 0,05$ ) em comparação com os leitões que consumiram dieta de baixa densidade nutricional. Nos demais órgãos, baço e timo, diferenças ( $P > 0,05$ ) não foram encontradas em seu peso absoluto em função das densidades nutricionais da dieta e nível de beta-glucano.

Não foram encontradas diferenças ( $P > 0,05$ ) no peso relativo do fígado e baço em função da idade de abate, com exceção do maior peso relativo do baço dos leitões abatidos aos 56 dias que consumiram dieta de baixa densidade nutricional com beta-glucanos em comparação com os abatidos aos 28 dias. Esse resultado pode ter sido decorrente do estímulo gerado pela inoculação de LPS, uma semana antes do segundo abate (56 dias), que induziu a migração de linfócitos (do tipo  $B_1$  e  $B_2$ ) do tecido conjuntivo (cavidade peritoneal) para o baço, dando início à sua proliferação e subsequente diferenciação em plasmócitos, uma vez que estes estão envolvidos no processamento dos fragmentos de LPS (antígenos circulantes) e na desintoxicação celular (Noal, 2009; Yang et al., 2007).

**Tabela 5.** Pesos absolutos e relativos de órgãos de leitões em função da época de abate, densidade nutricional e nível de beta-glucanos das dietas.

Peso dos Órgãos	Dietas <sup>1</sup>	Épocas de Abate (dias) <sup>2</sup>	
		28	56
Absoluto do fígado (g)	A0	415,2 ± 89 aAα	687,0 ± 120 aAβ
	Aβ	417,0 ± 80 aAα	726,6 ± 54 aBβ
	B0	371,0 ± 53 aAα	639,2 ± 57 aAβ
	Bβ	367,0 ± 40 aAα	645,0 ± 47 aAβ
Absoluto do baço (g)	A0	30,0 ± 14 aAα	53,2 ± 5 aAβ
	Aβ	25,0 ± 7 aAα	54,4 ± 12 aAβ
	B0	28,0 ± 3 aAα	56,0 ± 7 aAβ
	Bβ	22,0 ± 5 aAα	60,0 ± 16 aAβ
Absoluto do timo (g)	A0	18,0 ± 3 aAα	92,8 ± 7 aAβ
	Aβ	17,0 ± 5 aAα	95,6 ± 3 aAβ
	B0	18,0 ± 5 aAα	87,0 ± 10 aAβ
	Bβ	19,0 ± 7 aAα	90,8 ± 5 aAβ
Relativo do fígado (%)	A0	4,28 ± 0,41 aBα	4,03 ± 0,45 aAα
	Aβ	4,34 ± 0,58 aAα	4,13 ± 0,41 aAα
	B0	3,71 ± 0,27 aAα	4,01 ± 0,22 aAα
	Bβ	4,20 ± 0,43 aAα	3,97 ± 0,23 aAα
Relativo do baço (%)	A0	0,30 ± 0,07 aAα	0,32 ± 0,05 aAα
	Aβ	0,26 ± 0,06 aAα	0,31 ± 0,07 aAα
	B0	0,28 ± 0,03 aAα	0,35 ± 0,04 aAα
	Bβ	0,25 ± 0,05 aAα	0,37 ± 0,08 aAβ
Relativo do timo (%)	A0	0,19 ± 0,06 aAα	0,55 ± 0,04 aAβ
	Aβ	0,18 ± 0,04 aAα	0,54 ± 0,02 aAβ
	B0	0,19 ± 0,07 aAα	0,55 ± 0,008 aAβ
	Bβ	0,22 ± 0,07 aAα	0,56 ± 0,04 aAβ

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos; letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ) e letras gregas (28 x 56 dias)

<sup>2</sup> Média ± desvio padrão (n=5); teste de Bonferroni (P<0,05)

**Tabela 6.** Avaliações morfométricas do duodeno, jejuno e íleo de leitões em função da época de abate, densidade nutricional e nível de beta-glucanos das dietas.

Variáveis	Dietas <sup>1</sup>	Épocas de Abate (dias) <sup>2</sup>	
		28	56
AV Duodeno (µm)	A0	413,77 ± 86,51 aAα	397,09 ± 34,12 aAα
	Aβ	448,91 ± 65,54 aAβ	353,81 ± 42,48 aAα
	B0	489,75 ± 66,78 bBβ	391,26 ± 13,08 aAα
	Bβ	402,51 ± 43,43 aAα	370,48 ± 13,17 aAα
PC Duodeno (µm)	A0	133,14 ± 11,83 aBα	126,18 ± 4,09 aAα
	Aβ	125,54 ± 2,90 aAα	132,80 ± 8,79 aAα
	B0	118,12 ± 8,32 aAα	126,97 ± 3,13 aAα
	Bβ	121,37 ± 8,35 aAα	134,30 ± 6,22 aAβ
AV:PC Duodeno	A0	3,09 ± 0,43 aAα	3,14 ± 0,27 aAα
	Aβ	3,58 ± 0,56 aAα	2,68 ± 0,44 aAα
	B0	4,14 ± 0,45 bBα	3,08 ± 0,13 aAα
	Bβ	3,32 ± 0,36 aAα	2,77 ± 0,19 aAα
AV Jejuno (µm)	A0	312,66 ± 7,44 aAα	317,52 ± 14,88 aAα
	Aβ	318,61 ± 12,41 aAα	313,81 ± 17,19 aAα
	B0	335,64 ± 28,95 bBα	320,97 ± 13,42 aAα
	Bβ	316,40 ± 5,11 aAα	311,77 ± 9,36 aAα
PC Jejuno (µm)	A0	122,33 ± 7,43 aAα	127,13 ± 10,91 aAα
	Aβ	126,29 ± 8,75 aAα	124,69 ± 5,75 aAα
	B0	119,91 ± 4,69 aAα	121,65 ± 3,85 aAα
	Bβ	120,76 ± 3,20 aAα	128,60 ± 15,63 aAα
AV:PC Jejuno	A0	2,57 ± 0,19 aAα	2,52 ± 0,28 aAα
	Aβ	2,53 ± 0,14 aAα	2,52 ± 0,19 aAα
	B0	2,81 ± 0,35 aBα	2,64 ± 0,11 aAα
	Bβ	2,62 ± 0,10 aAα	2,45 ± 0,24 aAα
PP Íleo (mm <sup>2</sup> )	A0	384,96 ± 66,55 aAα	382,58 ± 74,04 aAα
	Aβ	389,79 ± 35,40 aAα	401,82 ± 51,56 aAα
	B0	416,01 ± 67,91 aAα	387,26 ± 69,89 aAα
	Bβ	370,07 ± 39,84 aAα	356,05 ± 50,61 aAα

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos; Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos; letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ) e letras gregas (28 x 56 dias)

<sup>2</sup> Média ± desvio padrão (n=5); teste de Bonferroni (P<0,05)

Em contrapartida verificou-se diferenças (P<0,05) no peso relativo do timo que foi maior no abate aos 56 dias, independente da dieta, reflexo do aumento de seu peso absoluto em função do crescimento do leitão. O aumento do peso desse órgão

linfóide ocorre até a fase etária correspondente à puberdade, a partir da qual inicia sua regressão (Lima et al., 2009).

Além disso, observou-se maior ( $P < 0,05$ ) peso relativo do fígado, na ausência de beta-glucano, nos leitões abatidos aos 28 dias que consumiram dieta de alta densidade nutricional em comparação com os que consumiram dieta de baixa densidade nutricional.

Na avaliação das alterações estruturais do intestino delgado de leitões não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) em função da época de abate (28 x 56 dias) para altura de vilosidades (AV) e profundidade de criptas (PC) do jejuno e relação AV:PC do duodeno e jejuno, bem como para área das placas de Peyer do íleo.

Ainda verificou-se que a altura de vilosidades dos leitões abatidos aos 56 dias que consumiram as dietas de alta densidade com beta-glucano ou as dietas de baixa densidade sem beta-glucanos foram menores que os leitões abatidos aos 28 dias. Esse resultado está relacionado ao fato de que o tamanho médio das vilosidades tende a diminuir com a idade dos leitões em detrimento das alterações morfológicas intestinais transitórias nas primeiras semanas pós-desmame, que podem ser agravadas e/ou prolongadas em quadros inflamatórios causados por LPS (Pluske et al., 1996; Tucci et al., 2004; Mani et al., 2012).

Os valores da profundidade das criptas do duodeno dos leitões que consumiram dieta de baixa densidade nutricional contendo beta-glucanos foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos 56 dias quando comparados aos 28 dias. Considerando que a atividade mitótica das células das criptas é responsável pela renovação das células das vilosidades intestinais (Vega-López e Stokes, 1994), o seu aumento demonstra a capacidade de regeneração da mucosa intestinal dos leitões após o desmame, com o consequente aumento da necessidade de produção celular nas criptas, o que pode ter contribuído para o aumento em sua profundidade média (Miller et al., 1986; Cera et al., 1988).

Além disso, observou-se que a altura das vilosidades do duodeno e jejuno dos leitões abatidos aos 28 dias que consumiram dieta de baixa densidade nutricional sem beta-glucanos foi maior ( $P < 0,05$ ) em comparação com os que consumiram dieta de baixa densidade nutricional com beta-glucanos.

Em contrapartida, na ausência de beta-glucanos, os leitões abatidos aos 28 dias que consumiram dieta de baixa densidade nutricional apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) altura de vilosidades do duodeno e jejuno em comparação com os que consumiram a dieta de alta densidade nutricional. Esses resultados sugerem que a dieta de baixa

densidade nutricional sem beta-glucanos garantiu melhor capacidade absorptiva em razão da melhor integridade do epitélio intestinal, corroborando os estudos de Marion et al. (2002) e Pereira (2010).

Quanto à profundidade de criptas do duodeno observou-se que, na ausência de beta-glucanos, esta foi maior ( $P < 0,05$ ) nos leitões abatidos aos 28 dias que consumiram a dieta de alta densidade nutricional em comparação com os que consumiram a dieta de baixa densidade nutricional. Esse resultado é decorrente da maior atividade mitótica das criptas, devido à redução da altura das vilosidades em decorrência do aumento na taxa de descamação epitelial, pois as criptas asseguram o *turnover* celular e garantem a reposição das células perdidas da região apical das vilosidades (Hampson, 1986; Abreu, 1994; Pereira, 2010; Tibbets, 2002 e Araújo et al., 2006).

Com relação à profundidade de cripta do jejuno, não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) em função do nível de beta glucanos, da densidade nutricional das dietas e da época de abate. Esse resultado corrobora o encontrado por Leonard et al. (2011) quanto ao nível de beta-glucanos e com Pereira (2010) quanto à densidade nutricional das dietas.

A relação AV:PC do duodeno e jejuno, na ausência de beta-glucanos, foi maior ( $P < 0,05$ ) nos leitões abatidos aos 28 dias que consumiram a dieta de baixa densidade nutricional em comparação com os que consumiram a dieta de alta densidade nutricional. Em contrapartida, a relação AV:PC do duodeno foi maior ( $P < 0,05$ ) nos leitões abatidos aos 28 dias que consumiram a dieta de baixa densidade nutricional sem beta-glucanos em comparação com os que consumiram a dieta de baixa densidade com beta-glucanos.

A partir desses resultados pode-se inferir que a dieta de baixa densidade nutricional sem beta-glucano possibilitou condições para ocorrência de melhor absorção de nutrientes e menores perdas energéticas com a renovação celular do que a dieta de alta densidade nutricional (Araújo et al., 2006; Pereira, 2010; Leonard et al., 2011).

Para os resultados da área das placas de Peyer da submucosa intestinal do íleo não foram verificadas diferenças ( $P > 0,05$ ) em função da composição das dietas e época de abate. Apesar disso, verificou-se hiperplasia das placas, em detrimento da ativação de seus folículos linfóides, corroborando o verificado nos estudos de Chagoyán et al. (2002) após desafio com *Escherichia coli* sorotipo K<sub>12</sub> e administração de *Saccharomyces cerevisiae* cepa Sc<sub>47</sub>; de Stuyven et al. (2010) após administração



via oral de beta-glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* em associação com fímbrias F<sub>4</sub> de *Escherichia coli* enterotoxigênica e de Martins et al. (2013) após desafio com *Salmonella enterica enterica* sorovar Typhimurium.

#### 4. Conclusões

A adição de beta-glucanos e o uso de dietas de alta densidade nutricional não se justificaram para leitões desmamados dos 21 aos 59 dias de idade, pois no presente estudo não melhoraram o desempenho, peso dos órgãos e morfologia intestinal dos animais.

#### 5. Referências

- Abreu, M.L.T., 1994. Efeito da proteína do farelo de soja sobre o desempenho e ocorrência de alterações digestivas em leitões desmamados aos 21 dias de idade. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 79p.
- Araújo, L.F., Junqueira, O.M., Lopes, E.L., Araújo, C.S.S., Ortolan, J.H., Laurentiz, A.C., 2006. Utilização de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. *Ciência Rural* 36, 156-1581.
- Behmer, O.A., De Tolosa, E.M.C, Neto, A.G.F., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART, 241p.
- Brown, G.D., Gordon, S., 2003. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311–315.
- Cera, K.R., Mahan, D.C., Cross, R.F., Reinhart, G.A., Whitmoyer, R.E., 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *Journal of Animal Science* 66, 574-584.
- Chagoyán, J.C.V., Ibarzüengoytia, J.C., Salazar, H.G.M., Sotelo, L.S.P., Muñoz, R.F., Espinosa, J.L.Z., Bernabé, S.L., Alejandri, C., 2002. Estudio de los efectos de *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 proporcionada vía oral sobre el sistema inmunocompetente en credos infectados naturalmente con *E. coli*. In: V Seminario Internacional de Microbiología Aplicada a la Nutrición Animal, 5, 2002, Guadalajara. Anais..., Guadalajara.
- Dritz, S.S., Shi, J., Kielian, T.L., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Chengappa, M.M., Smith, J.E., Blecha, F., 1995. Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 73, 3341-3350.

- Eicher, S.D., Mckee, C.A., Carroll, J.A., Pajor, E.A., 2006. Supplemental vitamin C and yeast cell wall  $\beta$ -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *Journal of Animal Science* 84, 2352-2360.
- Guo, Y.M., Ali, R.A., Qureshi, M.A., 2003. The influence of  $\beta$ -glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 25, 461-472.
- Hahn, T.W., Lohakare, J.D., Lee, S.L., Moon, W.K., Chae, B.J., 2006. Effects of supplementation of  $\beta$ -glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity weanling pigs. *Journal of Animal Science* 84, 1422-1428.
- Hampson, D.J., 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science* 40, 32-40.
- Hwang, Y.H., Park, B.K., Lim, J.H., Kim, M.S., Song, I.B., Park, S.C., Jung, H.K., Hong, J.H., Yun, H.I., 2008. Effects of  $\beta$ -glucan from *Paenibacillus polymyxa* and L-theanine on growth performance and immunomodulation in weanling piglets. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* 21, 1753-1759.
- Johnson, R.W., Borell, E.V., 1994. Lipopolysaccharide-induced sickness behavior in piglets is inhibited by pretreatment with indomethacin. *Journal of Animal Science* 72, 309-314.
- Johnson, R.W., Escobar, J., Webel, D.M., 2001. Nutrition and Immunology of Swine. In: Lewis A.J. & Southern L.L. (Eds) *Swine Nutrition*. 2.ed. Nebraska: CRC Press, 545-562.
- Kummer, R., Gonçalves, M.A.D., Lippke, R.T., Passos, B.M.F., Marques, P., Mores, T.J., 2009. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. *Acta Scientiae Veterinariae* 37(Supl 1), s195-s209.
- Lallès, J., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society* 66, 260-268.
- Le Dividich, J., Sève, B., 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domestic Animal Endocrinology* 19, 63-74.
- Ledur, V.S., Ribeiro, A.M.L., Kessler, A.M., Gianfelici, M.F., Vieira, M.M., Grandi, J., Machinsky, T.G., 2012. Respostas fisiológicas e de desempenho de leitões suplementados com  $\beta$ -glucanos e desafiados imunologicamente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64, 434-442.
- Leonard, S.G., Sweeney, T., Bahar, B., Lynch, B.P., O'Doherty, J.V., 2011. Effects of dietary seaweed extract supplementation in sows and post-weaned pigs on

performance, intestinal morphology, intestinal microflora and immune status. *British Journal of Nutrition* 106, 688–699.

Li, J., Li, D.F., Xing, J.J., Cheng, Z.B., Lai, C.H., 2006. Effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 84, 2374-2381.

Lima, E.M.M., Silva, F.O.C, Rafael, E.L.S., Severino, R.S., Drummond, S.S., Bombonato, P.P., Dianese, D.M., 2009. Vascularização arterial dos lobos torácicos do timo de fetos de suínos da linhagem C40. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29, 863-867.

Mao, X.F., Piao, X.S., Lai, C.H., Li, D.F., Xing, J.J., Shi, B.L., 2005. Effects of  $\beta$ -glucan obtained from the Chinese herb *Astragalus membranaceus* and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotropic responses of weanling pigs. *Journal of Animal Science* 83, 2775-2782.

Mani, V., Weber, T.E., Baumgard, L.H., Gabler, N.K., 2012. Growth and development symposium: Endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *Journal of Animal Science*, 90, 1452-1465.

Marion, J., Biernat, M., Thomas, F., Savary, G., Le Breton, Y., Zabielski, R., Le Huërou-Luron, I., Le Dividich, J., 2002. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reproduction Nutrition Development* 42, 339–354.

Martins, R.P., Lorenzi, V., Arce, C., Lucena, C., Carvajal, A., Garrido, J.J. Innate and adaptive immune mechanisms are effectively induced in ileal Peyer's patches of *Salmonella* Typhimurium infected pigs. *Developmental and Comparative Immunology*, 41, 100-104, 2013.

Miguel, W.C., 2008. Suplementação de acidificantes em rações de leitões desmamados: desempenho e digestibilidade. Dissertação de Mestrado, SP, Pirassununga: USP, 52p.

Miller, B.G., James, P.S., Smith, M.W., Bourne, F.J., 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *Journal of Agriculture Science, Cambridge* 107, 579-589.

Mendes, C.B.S, Fontes, D.O., Guedes, R.M.C., Silva, F.C.O., Silva, M.A., Oliveira, J.S.V., Fernandes, I.S., Fontes, F.A.P.V., 2010. Suplementação de  $\beta$ -glucano a dietas de leitões de 21 a 60 dias de idade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62, 696-705.

- Noal, V.R., 2009. Estudo da interação de antígenos B-1 com antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: USP, 108p.
- Pereira, L.M., 2010. Energia metabolizável para leitões na fase inicial submetidos à ativação do sistema immune. Dissertação de Mestrado, MG, Lavras: UFLA, 68p.
- Pluske, J.R., Hampson, D.J., Williams, I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51, 215-236.
- Pluske, J.R., Williams, I.H., Aherne, F.X., 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Journal of Animal Science* 62, 131–144.
- Rakhshandeh, A., Lange, C.F.M., 2012. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal* 6, 305–310.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos (tabelas brasileiras). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 252p.
- SAS Institute Inc., SAS/STAT. User's guide, version 8. Cary: SAS Institute Inc., 1999.
- Silva, I.J.O. Qualidade do ambiente e instalações na produção industrial de suínos. In: Seminário Internacional de Suinocultura, v.4, 1999. Anais...Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1999, 108-325.
- Stuyven, E., Broeck, W.V., Nauwynck, H., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2010. Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan Macrogard fails to enhance the mucosal immune response following oral F4 fimbrial immunisation in gnotobiotic pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137, 291-297.
- Tibbets, G.W. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal protein sources in food animal diets. In: Annual Symposium of Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, 18...2002, Lexington. Anais... Lexington: Nottingham University Press, 2002. 435-443.
- Tucci, F.M., Thomaz, M.C., Kronka, R.N., Hannas, M.I., Loddi, M.M., Scandolera, A.J., Budiño, F.E.L., 2004. Efeitos da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a ultra-estrutura do intestino delgado. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2004, Campo Grande, Anais... Campo Grande: SBZ.

- Van Heugten, E., Spears, J.W., Coffey, M.T., 1994. The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. *Journal of Animal Science* 72, 2661.
- Vega-López, M.A., Stokes, C.R., 1994. Desarrollo del sistema immune intestinal porcino. *Tecnica Pecuaria en Mexico* 32, 30-38.
- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. *Physiology & Behaviour* 94, 276-284.
- Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H., 1997. Time course of increased plasma cytokines and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 75, 1514–1520.
- Williamson, G., Damani, K., Devenney, P., Faulds, C.B., Morris, V.J., Stevens, B.J.H., 1992. Mechanism of action of cyclic  $\beta$ -1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: Competition between cyclization and elongation reactions. *Journal of Bacteriology* 174, 7941-7947.
- Yang, Y., Tung, J.W., Ghosn, E.E., Herzenberg, L.A., 2007. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 4542-4546.
- Young, S., Ye, J., Frazer, D.G., Shi, X., Castranova, V., 2001. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glucan (Zymosan)-activated macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 20781–20787.
- Zekovic, D.B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M.M., Jakovljevic, D., Moran, C.A., 2005. Natural and modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 205–230.

## **CAPÍTULO 3**

## **Efeito de beta-glucanos e da densidade nutricional da dieta sobre os parâmetros sanguíneos de leitões imunologicamente desafiados**

### RESUMO

Os beta-glucanos exercem influência na modulação do sistema imune e na melhoria da resistência dos animais à infecção. Do mesmo modo, nutrientes são necessários para a multiplicação celular durante a resposta imune e para a síntese de moléculas relacionadas à comunicação celular. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da adição de beta-glucanos, originários da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em dietas com densidades nutricionais distintas para 36 leitões desmamados aos 21 dias de idade, submetidos a desafio com 150 µg kg<sup>-1</sup> de PV de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sorotipo 055:B5, sobre os parâmetros hematológicos, imunológicos e bioquímicos. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 (dois níveis de beta-glucanos: 0 e 300 ppm e dois níveis de energia metabolizável: 3300 e 3450 kcal kg<sup>-1</sup>), com nove repetições por tratamento e um leitão por unidade experimental. Os resultados foram submetidos à análise de variância multivariada, sendo as médias comparadas pelo teste de Bonferroni (P<0,05) quando paramétricas e, pelo teste de Dunn (P<0,05) quando não paramétricas. As dietas de baixa densidade nutricional fornecidas foram suficientes para atender às necessidades de aminoácidos e energia para a síntese de anticorpos e proteínas de fase aguda. Os efeitos dos beta-glucanos no hemograma e variáveis bioquímicas não foram suficientes para comprovar a magnitude de sua ação imunomoduladora. Os resultados de alanina amino-transferase, fosfatase alcalina e creatinina evidenciaram que a dose de LPS empregada não provocou danos hepáticos nem renais aos animais. A adição de beta-glucanos e o uso de dietas de maior densidade nutricional não se justificaram para leitões dos 21 aos 59 dias de idade.

Palavras-chave: imunomodulação, endotoxinas, hematologia

## **Effects of beta-glucans and nutritional density of diet on blood profiles of weanling pigs immunologically challenged**

### **ABSTRACT**

The beta-glucans influence the modulation of the immune system and improve the resistance to infection. Thus, nutrients are required for cell proliferation during the immune response, and for the synthesis of molecules related to cell communication. An experiment was conducted to evaluate the effects of two levels of beta-glucans (0 and 300 ppm) of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and two levels of energy (3300 and 3450 kcal ME kg<sup>-1</sup>) on the haematological, immunological, and biochemical profiles of 36 weanling pigs at 21 days of age, challenged with 150 µg kg<sup>-1</sup> of BW lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* serotype 055:B5. The experimental design was a randomized complete block design in a 2 x 2 factorial arrangement with nine replications per treatment, and one animal per experimental unit. Data were analyzed in accordance with multivariate analysis procedure by SAS, and the treatment means compared by Bonferroni test (P<0.05) when parametric and, by Dunn test (P<0.05) for non-parametric data. The low nutrient density diet provided enough amino acids and energy for synthesis of antibodies and acute phase proteins. Furthermore, data of blood profiles of alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and, creatinine showed that LPS did not cause kidney or liver damage to animals. Therefore, the addition of beta-glucan and the use of high nutrient density are not justified for pigs from 21 to 59 days of age.

Keywords: immunomodulation, endotoxins, hematology



## 1. Introdução

O sistema imune é o responsável pela elaboração da resposta imunológica, composta por mecanismos de defesa específicos e inespecíficos, que visam primariamente reconhecer e diferenciar o estímulo ao qual é submetido, distinguindo estruturas próprias das de agentes estranhos e, em seguida, combater o agente agressor, seja ele vírus, bactéria, fungo, protozoário, toxina ou qualquer substância estranha (Colditz, 2002; Wood, 2006).

A ativação dos mecanismos de resposta imune impõe a demanda por nutrientes que, ao invés de serem direcionados para o crescimento dos leitões são redirecionados para auxiliar a resposta do sistema imune do animal contra agentes patogênicos (Johnson et al., 2001). O desafio sanitário ativa a resposta inflamatória que, por sua vez, aumenta a necessidade de energia e de nutrientes específicos visando sintetizar os constituintes de defesa (Baracos et al., 1987), ao mesmo tempo em que reduz o consumo de alimento, comprometendo o desempenho animal (Johnson, 1997; Le Dividich e Sève, 2000).

Portanto, a nutrição exerce influência na modulação do sistema imune e na melhoria da resistência dos animais à infecção, já que os nutrientes são necessários para a multiplicação celular durante a resposta imune (fagócitos, linfócitos) e para a síntese de moléculas efetoras (anticorpos, sistema complemento, óxido nítrico, lisozimas) ou de moléculas relacionadas à comunicação celular (citocinas, mediadores inflamatórios) (Johnson et al., 2001; Volman et al., 2008). Além de também exercerem efeito indireto na resposta imune ao modificarem as vias de comunicação celulares (citocinas) ou limitar efeitos indesejáveis de moléculas efetoras (Johnson et al., 2001; Ribeiro et al., 2008).

Deste modo, o sistema imune pode ser modulado pela utilização de alguns aditivos, capazes de melhorar a responsividade e a função das células imunológicas, resultando em aumento dos mecanismos inespecíficos de defesa nos animais. Nesse contexto, os beta-glucanos estimulam os órgãos linfóides primários e secundários, potencializam a atividade dos macrófagos, ativam a função antimicrobiana de células mononucleares (Williams, 1997; Tzianabos, 2000; Guo et al., 2003; Zekovic et al., 2005) e contribuem para o aumento da resistência às infecções por aumentar a atividade dos leucócitos, do *burst* respiratório, da produção de citocinas pró-inflamatórias (Adachi et al., 1994; Olson et al., 1996; Young et al., 2001) e da produção de quimiocinas (Williams, 1997; Volman et al., 2008).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas fornecidas a leitões desmamados desafiados imunologicamente sobre os parâmetros sanguíneos, imunológicos e bioquímicos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Localização, animais e alojamento**

O experimento foi conduzido na área de Suinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, câmpus de Botucatu, com 36 leitões (18 machos e 18 fêmeas) mestiços de genética comercial, desmamados aos 21 dias de idade e com peso médio de  $6,45 \pm 0,33$  kg. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/UNESP/Botucatu, protocolo número 36/2011.

Os animais foram alojados em um galpão de creche de alvenaria com pé direito de 3,5 m e com cortinas laterais, em baias metálicas suspensas, com área de  $1,70 \text{ m}^2$ , equipadas com comedouro, bebedouro tipo chupeta e campânula com resistência elétrica, sendo a parte anterior do piso, sob o comedouro e a campânula, de concreto compacto e a parte posterior, composta por piso plástico. Sob as baias foi mantida lâmina d'água, que era substituída uma ou duas vezes por semana, dependendo do volume de dejetos produzidos.

### **2.2 Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial  $2 \times 2$  (dietas com dois níveis de beta-glucanos provenientes da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: ausente e 300 ppm e, duas densidades nutricionais baixa: 3300 kcal de EM  $\text{kg}^{-1}$  e elevada: 3450 kcal de EM  $\text{kg}^{-1}$ ), com nove repetições por tratamento e um leitão por unidade experimental.

### **2.3 Composição das dietas e arraçoamento**

Durante o período experimental, os animais receberam três tipos de dietas à vontade, de acordo com o sistema de arraçoamento por fases, dieta pré-inicial I nos primeiros 16 dias, dieta pré-inicial II dos 17 aos 28 dias e inicial dos 29 aos 38 dias pós-desmame (Tabelas 1 e 2). As dietas com densidade nutricional baixa (B) e elevada (A) foram formuladas para apresentarem 3300 e 3450 kcal de EM  $\text{kg}^{-1}$ ,

respectivamente, e mesmas relações energia metabolizável:nutrientes recomendadas por Rostagno et al. (2011).

A fonte de beta-glucanos utilizada apresentava em sua composição 60% de beta-glucanos purificados com ramificações  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6 e foi adicionada às dietas em substituição a igual quantidade de material inerte (caulim).

**Tabela 1.** Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).

Ingredientes	Pré-inicial I		Pré-inicial II		Inicial	
	B	A	B	A	B	A
Milho	50,877	48,170	57,409	52,485	65,925	62,180
Farelo de soja	20,00	20,00	24,00	24,00	26,00	26,00
Sangue, hemácias	1,50	1,50	1,50	1,50	-	-
Açúcar	2,50	2,50	2,00	4,00	2,75	3,80
Leite em pó desnatado	6,00	6,00	3,00	3,00	-	-
Soro de leite	8,00	8,00	7,00	7,00	-	-
Maltodextrina	4,40	4,40	-	-	-	-
Óleo de soja	0,70	3,20	1,30	4,00	1,50	4,00
Farelo de glúten de milho (60%)	1,80	1,80	-	-	-	-
Caulim	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Calcário	0,74	0,75	0,83	0,84	0,82	0,82
Fosfato bicálcico	1,30	1,30	1,22	1,22	1,40	1,42
Cloreto de sódio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
L-Lisina.HCl (78%)	0,56	0,65	0,41	0,50	0,50	0,58
DL-Metionina (99%)	0,25	0,30	0,20	0,25	0,16	0,20
L-Treonina (98%)	0,23	0,28	0,16	0,22	0,17	0,22
L-Triptofano (98%)	0,053	0,062	0,027	0,035	0,026	0,036
Óxido de zinco (73%)	0,34	0,34	0,20	0,20	-	-
BHT <sup>1</sup>	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Edulcorante <sup>2</sup>	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Cloreto de colina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Premix mineral <sup>3</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico <sup>4</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> Butil-hidroxi-tolueno; <sup>2</sup> Sucran<sup>®</sup> (sacarina sódica); <sup>3</sup> Premix mineral fornecendo por kg de ração: 100 mg Fe, 10 mg Cu, 30 mg de Se, 40 mg Mn, 100 mg Zn, 1 mg Co, 1,5 mg I; <sup>4</sup> Premix vitamínico fornecendo por kg de ração: 9000 UI vit. A, 2250 UI vit. D<sub>3</sub>, 22,5 mg vit. E, 22,5 mg vit. K<sub>3</sub>, 2,03 mg vit. B<sub>1</sub>, 6 mg vit. B<sub>2</sub>, 3 mg vit. B<sub>6</sub>, 30 µg vit. B<sub>12</sub>, 0,9 mg ácido fólico, 14,03 mg ácido pantotênico, 30 mg niacina, 0,12 mg biotina, 400 mg de colina.

## 2.4 Inoculação de LPS

Os leitões receberam injeção intramuscular de 150 µg kg<sup>-1</sup> de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (SIGMA ALDRICH L2880, St. Louis, MO), dissolvidos em 1 mL de solução salina no 14° e no 28° dias do período experimental (35 e 49 dias de idade média dos leitões). Neste procedimento foram utilizadas agulhas hipodérmicas de 0,55 x 20 mm (24 G x 3/4”) acopladas às seringas de 5 mL. A dose de LPS foi baseada em estudos preliminares (Johnson e Borell, 1994; Van Heugten et al., 1994; Webel et al., 1997; Rakhshandeh e Lange, 2012).

**Tabela 2.** Valores nutricionais calculados das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais com densidade nutricional baixa (B) ou elevada (A).

Itens	Pré-inicial I		Pré-inicial II		Inicial	
	B	A	B	A	B	A
EM (kcal kg <sup>-1</sup> )	3300	3450	3300	3450	3300	3450
PB (%)	19,00	19,00	19,00	19,00	18,00	18,00
Lisina dig. (%)	1,41	1,47	1,30	1,36	1,17	1,22
Metionina dig. (%)	0,54	0,58	0,47	0,51	0,40	0,43
Treonina dig. (%)	0,89	0,92	0,82	0,86	0,74	0,77
Triptofano dig. (%)	0,25	0,26	0,23	0,24	0,21	0,21
Metionina + cisteína dig. (%)	0,79	0,83	0,73	0,76	0,65	0,68
Ca (%)	0,83	0,83	0,81	0,81	0,77	0,77
P dig. (%)	0,44	0,44	0,40	0,40	0,38	0,38
Lactose equivalente	10,00	10,00	5,00	5,00	0,00	0,00

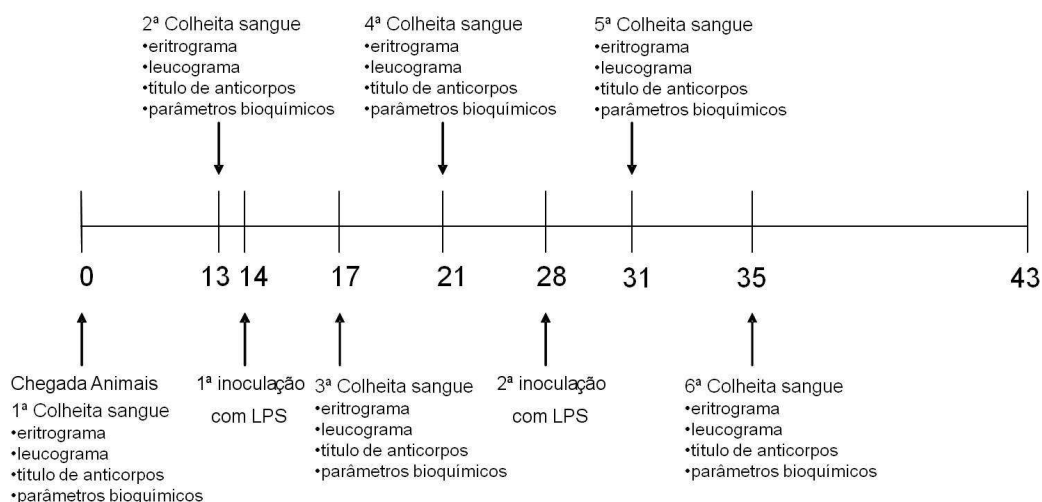
## 2.5 Coleta, preparo e análise das amostras

As colheitas de sangue foram realizadas por punção da veia cava usando agulhas siliconizadas para coleta de sangue pelo sistema a vácuo de 25 x 8 mm (21 G x 1”) durante as fases pré-iniciais e agulhas de 40 x 9 mm (20 G x 1 1/2”) na fase inicial.

Para determinação dos parâmetros hematimétricos e leucométricos foram utilizados tubos para coleta a vácuo de 4 mL contendo anticoagulante EDTA e para determinação dos títulos de anticorpos (IgG e IgM) e parâmetros bioquímicos utilizaram-se tubos de coleta a vácuo de 10 mL contendo somente ativador de coágulo, conforme os momentos de colheita apresentados na Figura 2.

A série hematimétrica e leucométrica global foi obtida com auxílio de um contador veterinário automático de células MC-6200 Vet (Shenzhen Maxcom

Electronic, China), sendo a confirmação da leucometria específica realizada através de esfregaço sanguíneo por coloração diferencial pelo método panótico, segundo Dacie e Lewis (1995). A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta.



**Figura 2.** Esquema representativo das colheitas de sangue e das análises realizadas.

As avaliações dos títulos de anticorpos (IgG e IgM) foram realizadas pela técnica de nefelometria – reação de precipitação, segundo procedimentos analíticos descritos pela AOAC (1995).

Para as determinações dos parâmetros bioquímicos foi utilizado o analisador veterinário automático, modelo Cobas Mira, marca Roche Diagnostics. As metodologias adotadas, bem como os reativos utilizados são apresentados conforme segue: uréia plasmática ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) por análise cinética de tempo fixo – kit comercial da Bioclin; proteínas totais ( $\text{g dL}^{-1}$ ): método do biureto – kit comercial da Labtest; albuminas ( $\text{g dL}^{-1}$ ): método espectrofotométrico do verde de bromocresol – kit comercial da Labtest; globulinas ( $\text{g dL}^{-1}$ ): resultados obtidos a partir da diferença entre os resultados das quantificações das proteínas totais e das albuminas; fosfatase alcalina ( $\text{U.I. L}^{-1}$ ): método enzimático UV, segundo Bowers e Mc Comb (1966) – kit comercial da Labtest; alanina amino-transferase (ALT) ( $\text{U.I. L}^{-1}$ ): método cinético UV – kit comercial da Ebram; creatinina ( $\text{mg dL}^{-1}$ ): método cinético direto da reação de Jaffé – kit comercial da Bioclin e proteína C reativa ( $\text{mg L}^{-1}$ ): método imunoturbidimétrico – kit comercial da Bioclin. Todas as quantificações seguiram as recomendações analíticas estabelecidas pela AOAC (1995).

## 2.6 Análise estatística

Os dados paramétricos e não paramétricos foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes utilizando o procedimento *Profile Analysis* (Multivariate – SAS/IML) do SAS (1999), complementado com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ( $P < 0,05$ ) para os dados paramétricos e com o teste de comparações múltiplas de Dunn ( $P < 0,05$ ) para os dados não paramétricos.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Eritrograma

Os parâmetros hematimétricos avaliados em função das dietas experimentais são apresentados na Tabela 3 e os valores de referência para esses parâmetros encontram-se no Anexo 1.

Com relação à concentração de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) observaram-se diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os períodos de colheita de sangue. No entanto, apesar dessa variação, todos os valores encontraram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie suína segundo Miller et al. (1961), Tumbleson et al. (1986), Friendship e Henry (1992), Jain (1996), Kaneko et al. (1997), Feldman et al. (2000), Tizard (2002).

Na ausência de beta-glucanos, a dieta de baixa densidade nutricional promoveu aumento ( $P < 0,05$ ) nas concentrações de eritrócitos e de hematócrito por ocasião da segunda colheita sanguínea e nos valores de hemoglobina e hematócrito na terceira colheita de sangue, em relação aos animais que receberam dieta de alta densidade nutricional. Em contrapartida, a presença de beta-glucanos determinou menores valores ( $P < 0,05$ ) de eritrócitos e de hemoglobina na terceira colheita de sangue, quando a dieta apresentava baixa densidade nutricional, o que em parte pode ser atribuído ao menor valor de hematócrito verificado na primeira colheita de sangue (antes da aplicação dos tratamentos) nos leitões que iriam receber a dieta de baixa densidade nutricional com beta-glucanos.

Na presença de beta-glucanos, a dieta de alta densidade nutricional aumentou ( $P < 0,05$ ) o valor de CHCM na terceira colheita de sangue comparado com os leitões alimentados com dieta de baixa densidade nutricional, contudo, na quinta colheita de sangue verificou-se efeito inverso.

**Tabela 3.** Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre o eritrograma de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.

Variável	Dietas <sup>1</sup>	Momentos de Colheita <sup>2</sup>					
		Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Colheita 6
<b>Eritrócitos</b> (x 10 <sup>6</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	5,84 ± 0,56 aAα	6,24 ± 0,44 aAαβ	5,93 ± 0,33 aAαβ	5,99 ± 0,38 aAαβ	6,34 ± 0,44 aAβγ	6,49 ± 0,53 aAγ
	<b>Aβ</b>	5,91 ± 0,51 aAα	6,55 ± 0,59 aAβ	6,25 ± 0,55 aAαβ	6,25 ± 0,61 aAαβ	6,47 ± 0,58 aAβ	6,53 ± 0,49 aAβ
	<b>B0</b>	5,98 ± 0,47 aAα	6,78 ± 0,27 aBγ	6,29 ± 0,35 bAαβ	6,24 ± 0,39 aAαβ	6,35 ± 0,57 aAαβ	6,53 ± 0,47 aAβγ
	<b>Bβ</b>	5,48 ± 0,13 aAα	6,39 ± 0,32 aAγθ	5,91 ± 0,37 aAαβ	6,07 ± 0,43 aAβγ	6,50 ± 0,40 aAγθ	6,67 ± 0,61 aAθ
<b>Hemoglobina</b> (g dL <sup>-1</sup> )	<b>A0</b>	11,37 ± 0,73 aAαβ	12,13 ± 0,87 aAβ	11,29 ± 0,77 aAαβ	11,74 ± 0,79 aAαβ	11,79 ± 1,21 aAαβ	12,06 ± 1,25 aAαβ
	<b>Aβ</b>	11,28 ± 0,70 aAα	12,06 ± 0,86 aAα	11,66 ± 0,51 aAα	11,87 ± 0,75 aAα	11,78 ± 0,96 aAα	12,03 ± 0,85 aAα
	<b>B0</b>	11,88 ± 0,53 aAα	12,97 ± 0,79 aAβ	11,99 ± 0,51 bBα	12,09 ± 0,58 aAα	11,77 ± 1,02 aAα	12,20 ± 0,82 aAα
	<b>Bβ</b>	10,84 ± 0,98 aAα	12,18 ± 0,94 aAβγ	11,30 ± 0,74 aAαβ	11,82 ± 0,67 aAβγ	11,87 ± 0,75 aAβγ	12,38 ± 0,97 aAγ
<b>Hematócrito</b> (%)	<b>A0</b>	33,87 ± 2,23 aAαβ	35,57 ± 2,61 aAαβ	33,41 ± 1,95 aAα	34,57 ± 2,58 aAαβ	35,34 ± 3,57 aAαβ	36,09 ± 3,71 aAβ
	<b>Aβ</b>	33,89 ± 2,19 aAα	35,96 ± 3,17 aAα	34,10 ± 1,73 aAα	35,07 ± 2,34 aAα	35,66 ± 3,44 aAα	35,53 ± 2,68 aAα
	<b>B0</b>	35,60 ± 1,74 bAα	38,28 ± 2,36 aBβ	35,30 ± 1,85 aBα	35,81 ± 1,96 aAα	35,56 ± 3,55 aAα	36,02 ± 2,97 aAαβ
	<b>Bβ</b>	32,88 ± 2,43 aAα	36,01 ± 2,84 aAβγ	33,81 ± 1,84 aAαβ	35,02 ± 2,52 aAαβγ	36,07 ± 2,17 aAβγ	36,90 ± 2,89 aAγ
<b>VCM</b> (fL)	<b>A0</b>	58,18 ± 2,72 aAβ	57,09 ± 3,26 aAαβ	56,39 ± 3,47 aAαβ	57,67 ± 3,26 aAαβ	55,70 ± 2,90 aAαβ	55,57 ± 3,39 aAα
	<b>Aβ</b>	57,50 ± 3,30 aAβ	55,07 ± 4,32 aAαβ	54,80 ± 3,96 aAα	56,32 ± 3,53 aAαβ	55,21 ± 3,64 aAαβ	54,54 ± 2,95 aAα
	<b>B0</b>	59,72 ± 4,20 aAβ	56,46 ± 2,59 aAα	56,22 ± 2,31 aAα	57,44 ± 1,89 aAαβ	55,99 ± 1,81 aAα	55,11 ± 1,97 aAα
	<b>Bβ</b>	60,00 ± 4,56 aAβ	56,43 ± 4,23 aAα	57,30 ± 3,56 aAαβ	57,74 ± 3,13 aAαβ	55,61 ± 3,15 aAα	55,42 ± 2,71 aAα
<b>HCM</b> (pg)	<b>A0</b>	19,52 ± 1,03 aAαβ	19,50 ± 1,14 aAαβ	19,06 ± 1,30 aAαβ	19,60 ± 1,05 aAβ	18,53 ± 1,05 aAα	18,58 ± 1,37 aAαβ
	<b>Aβ</b>	19,13 ± 1,33 aAβ	18,51 ± 1,65 aAαβ	18,78 ± 1,49 aAαβ	19,11 ± 1,38 aAαβ	18,26 ± 1,29 aAα	18,47 ± 1,03 aAαβ
	<b>B0</b>	19,56 ± 1,44 aAγ	19,09 ± 0,86 aAαβ	19,08 ± 0,77 aAαβ	19,40 ± 0,68 aAβγ	18,53 ± 0,70 aAα	18,71 ± 0,66 aAαβ
	<b>Bβ</b>	19,81 ± 1,84 aAγ	19,06 ± 1,47 aAαβγ	19,18 ± 1,16 aAαβγ	19,54 ± 1,04 aAβγ	18,30 ± 1,15 aAα	18,60 ± 1,01 aAαβ
<b>CHCM</b> (g dL <sup>-1</sup> )	<b>A0</b>	33,54 ± 0,45 aAαβ	34,12 ± 0,50 aAβ	33,81 ± 1,03 aAαβ	34,00 ± 0,46 aAαβ	33,28 ± 0,62 aAα	33,44 ± 1,17 aAαβ
	<b>Aβ</b>	33,28 ± 0,65 aAαβ	33,61 ± 1,40 aAαβ	34,26 ± 0,48 aBβ	33,90 ± 0,63 aAαβ	33,06 ± 1,06 aAα	33,87 ± 0,46 aAαβ
	<b>B0</b>	33,38 ± 0,57 aAαβ	33,83 ± 0,34 aAαβ	33,98 ± 0,61 aAβ	33,81 ± 0,80 aAαβ	33,13 ± 1,08 aAα	33,98 ± 0,54 aAβ
	<b>Bβ</b>	32,99 ± 0,80 aAα	33,80 ± 0,64 aAα	33,47 ± 0,72 aAα	33,84 ± 0,72 aAα	33,98 ± 0,99 aBα	33,56 ± 0,53 aAα

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos

Letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ); letras gregas (Colheita 1 x Colheita 2 x Colheita 3 x Colheita 4 x Colheita 5 x Colheita 6)

<sup>2</sup> Média ± desvio padrão (n=9), teste de Bonferroni (P<0,05)

### 3.2 Leucograma

Os parâmetros leucométricos avaliados são apresentados na Tabela 4 e os valores de referência (valores absolutos) de tais parâmetros encontram-se no Anexo 1.

Todos os parâmetros leucométricos, exceto os bastonetes e basófilos, apresentaram variação ( $P < 0,05$ ) nos diferentes momentos de colheita de sangue. Apesar da variação ocorrida, todos os resultados encontraram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie suína (Miller et al., 1961; Tumbleson et al., 1986; Friendship e Henry, 1992; Jain, 1996; Kaneko et al., 1997; Feldman et al., 2000; Tizard, 2002).

A dieta de baixa densidade nutricional sem beta-glucanos resultou em maiores concentrações ( $P < 0,05$ ) de eosinófilos e bastonetes no terceiro e quinto períodos de colheita de sangue, respectivamente, em relação à dieta de baixa densidade nutricional contendo beta-glucanos. Os resultados nestes períodos provavelmente foram consequência da maior mobilização celular desencadeada pela reação de inflamação aguda promovida pela aplicação de LPS. Esses resultados corroboram aqueles verificados por Chiquieri et al. (2007) que encontraram maior resposta na leucometria específica quando as rações não continham *Saccharomyces cerevisiae*.

Na quinta colheita de sangue, a concentração de bastonetes foi maior ( $P < 0,05$ ) nos leitões alimentados com a dieta de baixa densidade nutricional sem beta-glucanos, comparado com os animais que receberam dieta de alta densidade nutricional isenta de beta-glucanos. Isso sugere que a dieta de baixa densidade nutricional atendeu às exigências do organismo para a síntese dessas células de defesa frente ao desafio imposto pela aplicação de LPS na ativação do sistema imunológico dos leitões.

### 3.3 Anticorpos

Em relação à concentração dos anticorpos (Tabela 5), constatou-se que os níveis de IgG apresentaram o comportamento decrescente, enquanto que os níveis de IgM apresentaram o comportamento crescente ao longo dos períodos de colheita de sangue.



**Tabela 4.** Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre o leucograma de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.

Variável	Dietas <sup>1</sup>	Momentos de Colheita <sup>2</sup>					
		Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Colheita 6
<b>Leucócitos</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	11,656 ± 2,087 aAα	16,400 ± 2,078 aAβ	16,244 ± 2,820 aAβ	13,589 ± 1,234 aAα	18,733 ± 3,544 aAβ	16,800 ± 2,790 aAβ
	<b>Aβ</b>	12,433 ± 1,327 aAα	14,933 ± 2,745 aAαβ	15,644 ± 1,820 aAαβ	13,467 ± 1,749 aAαβ	18,456 ± 5,301 aAβ	16,500 ± 2,461 aAβ
	<b>B0</b>	12,344 ± 1,606 aAα	16,256 ± 3,773 aAαβγ	16,578 ± 2,259 aAαβγ	13,667 ± 1,853 aAαβ	21,100 ± 4,293 aAγ	18,611 ± 2,116 aAβγ
	<b>Bβ</b>	12,367 ± 2,364 aAα	16,156 ± 2,630 aAαβ	16,600 ± 1,285 aAβγ	14,178 ± 0,777 aAαβ	19,489 ± 3,338 aAγ	16,511 ± 2,095 aAβγ
<b>Linfócitos</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	4,151 ± 0,613 aAα	5,640 ± 0,832 aAβγ	5,804 ± 1,404 aAβγ	4,933 ± 0,918 aAαβ	6,675 ± 0,909 aAγ	5,770 ± 1,078 aAβγ
	<b>Aβ</b>	4,045 ± 0,827 aAα	4,994 ± 1,172 aAαβ	5,908 ± 1,193 aAαβ	5,117 ± 0,799 aAαβ	6,616 ± 2,035 aAαβ	5,904 ± 0,765 aAαβ
	<b>B0</b>	4,436 ± 0,613 aAα	5,825 ± 1,671 aAαβγ	6,350 ± 1,055 aAβγ	5,197 ± 0,596 aAαβ	7,689 ± 1,639 aAγ	6,530 ± 0,440 aAβγ
	<b>Bβ</b>	4,488 ± 0,867 aAα	5,405 ± 1,178 aAαβ	5,970 ± 0,837 aAβγ	5,092 ± 0,816 aAαβ	7,038 ± 1,402 aAγ	6,199 ± 1,031 aAβγ
<b>Monócitos</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	0,208 ± 0,067 aAαβ	0,260 ± 0,108 aAαβ	0,296 ± 0,156 aAαβ	0,198 ± 0,078 aAα	0,377 ± 0,136 aAβ	0,325 ± 0,168 aAαβ
	<b>Aβ</b>	0,199 ± 0,118 aAα	0,245 ± 0,101 aAα	0,257 ± 0,178 aAα	0,231 ± 0,109 aAα	0,342 ± 0,139 aAα	0,352 ± 0,126 aAα
	<b>B0</b>	0,150 ± 0,078 aAα	0,261 ± 0,145 aAα	0,275 ± 0,088 aAα	0,203 ± 0,113 aAα	0,312 ± 0,182 aAα	0,334 ± 0,140 aAα
	<b>Bβ</b>	0,209 ± 0,126 aAα	0,244 ± 0,171 aAαβ	0,331 ± 0,122 aAαβ	0,268 ± 0,052 aAαβ	0,397 ± 0,132 aAβ	0,366 ± 0,120 aAαβ
<b>Segmentados</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	6,823 ± 1,637 aAα	10,007 ± 1,590 aAβγ	9,577 ± 1,737 aAβγ	8,111 ± 0,962 aAαβ	11,393 ± 2,859 aAγ	10,357 ± 1,911 aAβγ
	<b>Aβ</b>	7,671 ± 1,201 aAα	9,254 ± 1,985 aAαβ	8,993 ± 1,019 aAαβ	7,790 ± 1,244 aAα	11,105 ± 3,467 aAβ	9,846 ± 2,058 aAαβ
	<b>B0</b>	7,267 ± 1,415 aAα	9,478 ± 2,311 aAαβ	9,459 ± 1,561 aAαβ	7,948 ± 1,681 aAα	12,547 ± 2,861 aAβ	11,261 ± 1,963 aAβ
	<b>Bβ</b>	7,190 ± 1,713 aAα	9,917 ± 1,552 aAβ	9,779 ± 1,206 aAαβ	8,441 ± 0,523 aAαβ	11,631 ± 2,586 aAβ	9,503 ± 1,132 aAαβ
<b>Plaquetas</b> (x 10 <sup>6</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	0,925 ± 0,151 aAβ	0,540 ± 0,206 aAα	0,609 ± 0,169 aAαβ	0,613 ± 0,219 aAαβ	0,517 ± 0,130 aAα	0,518 ± 0,110 aAα
	<b>Aβ</b>	0,904 ± 0,203 aAγ	0,692 ± 0,232 aAβ	0,652 ± 0,164 aAβ	0,664 ± 0,178 aAβ	0,494 ± 0,126 aAα	0,544 ± 0,156 aAαβ
	<b>B0</b>	0,865 ± 0,164 aAβ	0,565 ± 0,101 aAα	0,626 ± 0,132 aAαβ	0,661 ± 0,107 aAαβ	0,463 ± 0,132 aAα	0,581 ± 0,254 aAα
	<b>Bβ</b>	0,839 ± 0,101 aAγ	0,611 ± 0,143 aAαβ	0,556 ± 0,154 aAαβ	0,650 ± 0,154 aAβ	0,456 ± 0,113 aAα	0,550 ± 0,185 aAαβ

Continua...

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos

Letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ); letras gregas (Colheita 1 x Colheita 2 x Colheita 3 x Colheita 4 x Colheita 5 x Colheita 6)

<sup>2</sup> Média ± desvio padrão (n=9); teste de Bonferroni (P<0,05)

Variável	Dietas <sup>1</sup>	Momentos de Colheita <sup>2</sup>					
		Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Coleta 6
<b>Bastonetes</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	0,212 (0,118; 0,392) aAα	0,157 (0,000; 0,394) aAα	0,174 (0,124; 0,399) aAα	0,156 (0,120; 0,294) aAα	0,157 (0,000; 0,326) aAα	0,167 (0,000; 0,416) aAα
	<b>Aβ</b>	0,270 (0,101; 0,411) aAα	0,207 (0,140; 0,489) aAα	0,177 (0,123; 0,513) aAα	0,212 (0,120; 0,320) aAα	0,224 (0,078; 0,468) aAα	0,184(0,107; 0,332) aAα
	<b>B0</b>	0,242 (0,118; 0,303) aAα	0,237 (0,136; 0,364) aAα	0,176 (0,140; 0,326) aAα	0,256 (0,000; 0,384) aAα	0,392 (0,000; 0,490) bBα	0,199 (0,147; 0,406) aAα
	<b>Bβ</b>	0,210 (0,000; 0,429) aAα	0,292 (0,107; 0,483) aAα	0,324 (0,141; 0,364) aAα	0,158 (0,136; 0,441) aAα	0,227 (0,149; 0,438) aAα	0,183 (0,000; 0,378) aAα
<b>Eosinófilos</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	0,165 (0,095; 0,392) aAα	0,286 (0,155; 0,591) aAα	0,308 (0,159; 0,456) aAα	0,135 (0,000; 0,272) aAα	0,124 (0,000; 0,344) aAα	0,000 (0,000; 0,416) aAα
	<b>Aβ</b>	0,252 (0,101; 0,342) aAβ	0,159 (0,000; 0,420) aAαβ	0,177 (0,149; 0,342) aAαβ	0,000 (0,000; 0,160) aAαβ	0,117 (0,000; 0,225) aAαβ	0,107 (0,000; 0,340) aAαβ
	<b>B0</b>	0,256 (0,096; 0,544) aAαβ	0,356 (0,101; 0,780) aAβ	0,320 (0,140; 0,528) bAαβ	0,126 (0,000; 0,166) aAα	0,204 (0,000; 0,440) aAα	0,184 (0,000; 0,398) aAα
	<b>Bβ</b>	0,214 (0,084; 0,572) aAα	0,214 (0,000; 0,762) aAα	0,171 (0,000; 0,362) aAα	0,136 (0,000; 0,294) aAα	0,139 (0,000; 0,227) aAα	0,161 (0,000; 0,378) aAα
<b>Basófilos</b> (x 10 <sup>3</sup> céls mm <sup>-3</sup> )	<b>A0</b>	0,000 (0,000; 0,165) aAα	0,000 (0,000; 0,157) aAα	0,000 (0,000; 0,218) aAα	0,000 (0,000; 0,136) aAα	0,000 (0,000; 0,205) aAα	0,000 (0,000; 0,167) aAα
	<b>Aβ</b>	0,000 (0,000; 0,228) aAα	0,000 (0,000; 0,000) aAα	0,000 (0,000; 0,302) aAα	0,000 (0,000; 0,212) aAα	0,000 (0,000; 0,207) aAα	0,000 (0,000; 0,182) aAα
	<b>B0</b>	0,000 (0,000; 0,121) aAα	0,000 (0,000; 0,156) aAα	0,000 (0,000; 0,000) aAα	0,000 (0,000; 0,128) aAα	0,000 (0,000; 0,220) aAα	0,000 (0,000; 0,189) aAα
	<b>Bβ</b>	0,000 (0,000; 0,121) aAα	0,000 (0,000; 0,174) aAα	0,000 (0,000; 0,175) aAα	0,000 (0,000; 0,147) aAα	0,000 (0,000; 0,170) aAα	0,000 (0,000; 0,189) aAα

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos

Letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ); letras gregas (Colheita 1 x Colheita 2 x Colheita 3 x Colheita 4 x Colheita 5 x Colheita 6)

<sup>2</sup> Mediana (valor mínimo; valor máximo) (n=9); teste de Dunn (P<0,05)

Resultados obtidos por Porter e Hill (1970), ao analisarem as alterações nos títulos de IgA, IgG e IgM de leitões desafiados com sorotipos 08 e 0141 de *Escherichia coli* e por Stuyven et al. (2010) ao administrarem via oral 200 mg de beta-glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* em associação com 1 mg de fímbrias F<sub>4</sub> de *Escherichia coli* enterotoxigênica aos leitões de 21 e 36 dias de idade, corroboram o comportamento observado para IgG e IgM no presente estudo, sugerindo que o comportamento dessas imunoglobulinas sofreu variação conforme exposição aos antígenos (vacinação ou inoculação de antígenos).

Apesar de não terem sido observados efeitos ( $P>0,05$ ) da densidade nutricional e da presença de beta-glucanos nas dietas sobre as concentrações de IgG e de IgM, os resultados apresentados na Tabela 5 evidenciam que o *status* imunológico desses animais pode ser explicado pelo comportamento natural (cinética) dessas imunoglobulinas no decorrer do tempo, uma vez que os leitões foram vacinados contra *Mycoplasma spp.* no momento do desmame na granja comercial.

Constatou-se ainda variação ( $P<0,05$ ) da concentração de IgG nos períodos de colheita de sangue 5 e 6 (após inoculação de LPS) em relação aos períodos 1 e 2 (antes da inoculação de LPS). Esses resultados são consistentes com os observados por Curtis e Bourne (1971), Klobasa et al. (1986) e Moraes et al. (2010), que verificaram que o comportamento dessas imunoglobulinas é regulado pelos mecanismos homeostáticos, variando conforme a idade dos animais, uma vez que esse declínio ocorre, em parte, pelo aumento do volume sanguíneo à medida que o animal cresce.

### 3.4 Bioquímica

Os parâmetros bioquímicos avaliados são apresentados na Tabela 6 e os valores de referência (valores absolutos) desses parâmetros encontram-se no Anexo 1.

Os níveis de fosfatase alcalina, enzima presente nas células que circundam os ductos biliares do fígado e nos tecidos ósseo e placentário não indicaram nenhuma alteração hepática em razão da dose aplicada de LPS. Os níveis obtidos para esta variável encontraram-se no intervalo de normalidade para a espécie suína (Miller et al., 1961; Tumbleson et al., 1986; Friendship e Henry, 1992; Jain, 1996; Kaneko et al., 1997; Feldman et al., 2000; Tizard, 2002), sendo a variação observada ao longo das colheitas de sangue atribuída ao fato dos animais estarem em crescimento (Nunes e Moreira, 2007).

**Tabela 5.** Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre os níveis de anticorpos de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.

Variável	Dietas <sup>1</sup>	Momentos de Colheita <sup>2</sup>					
		Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Colheita 6
IgG (mg dL <sup>-1</sup> )	A0	346,0 (108,0; 488,0)	238,0 (73,5; 352,0)	110,0 (61,7; 296,0)	101,0 (60,9; 259,0)	92,0 (54,5; 107,0)	89,0 (49,3; 113,0)
		aAβ	aAβ	aAαβ	aAαβ	aAα	aAα
	Aβ	321,0 (229,0; 473,0)	233,0 (106,0; 691,0)	108,0 (95,9; 230,0)	102,0 (85,0; 234,0)	86,9 (71,2; 99,2)	92,9 (66,9; 113,0)
		aAβ	aAβ	aAαβ	aAαβ	aAα	aAα
	B0	384,0 (105,0; 486,0)	234,0 (107,0; 355,0)	115,0 (99,0; 273,0)	105,0 (83,2; 238,0)	85,1 (36,4; 115,0)	95,8 (86,4; 205,0)
		aAβ	aAβ	aAαβ	aAαβ	aAα	aAα
	Bβ	348,0 (105,0; 479,0)	234,0 (92,5; 301,0)	112,0 (78,1; 235,0)	98,7 (78,3; 204,0)	86,5 (51,6; 105,0)	85,1 (59,9; 211,0)
		aAβ	aAβ	aAαβ	aAαβ	aAα	aAα
IgM (mg dL <sup>-1</sup> )	A0	14,80 (8,68; 17,00)	17,80 (13,30; 31,30)	22,80 (16,90; 45,80)	19,90 (14,70; 36,50)	27,10 (16,70; 62,00)	34,80 (17,90; 83,40)
		aAα	aAαβ	aAβ	aAαβ	aAβ	aAβ
	Aβ	15,20 (11,80; 18,00)	14,40 (11,90; 21,30)	20,60 (16,90; 41,80)	22,90 (17,20; 33,60)	38,80 (20,50; 81,00)	58,70 (46,00; 79,40)
		aAα	aAα	aAαβ	aAαβ	aAβ	aAβ
	B0	15,70 (9,41; 40,20)	17,80 (12,20; 37,00)	22,60 (17,30; 55,30)	21,80 (14,50; 35,10)	29,20 (13,10; 63,10)	42,10 (21,00; 88,80)
		aAα	aAαβ	aAαβ	aAαβ	aAβγ	aAγ
	Bβ	14,00 (4,92; 20,20)	16,50 (11,90; 20,40)	20,10 (16,80; 49,20)	21,30 (17,10; 36,20)	42,60 (27,60; 80,50)	49,10 (26,50; 90,80)
		aAα	aAα	aAαβ	aAαβ	aAβ	aAβ

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos  
Letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ); letras gregas (Colheita 1 x Colheita 2 x Colheita 3 x Colheita 4 x Colheita 5 x Colheita 6)

<sup>2</sup> Mediana (valor mínimo; valor máximo) (n=9); teste de Dunn (P<0,05)

Na segunda colheita de sangue, a dieta de alta densidade nutricional com beta-glucanos determinou menor nível ( $P < 0,05$ ) de alanina amino-transferase (ALT) em comparação com a dieta de alta densidade sem beta-glucanos. Este resultado talvez possa ser explicado pela ação do beta-glucano na redução do efeito inflamatório promovido pela síntese de prostaglandinas a partir do maior aporte de ácido araquidônico, intermediário do metabolismo do ácido linoléico, nas dietas de alta densidade (Kinsella et al., 1990; Spurlock et al., 1997). Os valores observados para ALT, enzima presente nos hepatócitos, sugerem não ter promovido alterações na função hepática em detrimento da dose adotada de LPS.

Com relação às concentrações de proteínas totais e frações (albuminas e globulinas) as variações ( $P < 0,05$ ) encontradas entre as diferentes colheitas de sangue situaram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie de acordo com Miller et al. (1961), Tumbleson et al. (1986), Friendship e Henry (1992), Jain (1996), Kaneko et al. (1997), Feldman et al. (2000), Tizard (2002).

Na terceira colheita de sangue, constatou-se quadro de hipoglobulinemia menos acentuado ( $P < 0,05$ ) nos leitões que receberam dieta com alta densidade nutricional com beta-glucanos em comparação com aqueles que receberam dieta de alta densidade nutricional sem beta-glucanos. Este resultado sugere que os beta-glucanos minimizaram o catabolismo protéico de globulinas, ou seja, o direcionamento das mesmas para a síntese de mediadores inflamatórios, a exemplo das citocinas, como também de proteínas de fase aguda, a exemplo das haptoglobulinas e  $\alpha_2$ -globulinas séricas (Wilson e Svendsen, 1972; Spurlock et al., 1997).

Na sexta colheita de sangue verificou-se ainda que, na ausência de beta-glucanos, a dieta de alta densidade nutricional causou redução nos teores de proteínas totais e de globulinas em comparação com a dieta de baixa densidade nutricional. Este resultado pode ser decorrente da maior utilização de aminoácidos direcionados da dieta de alta densidade nutricional para a síntese de citocinas, como também de proteínas de fase aguda, em razão do quadro de inflamação aguda desencadeado pela aplicação de LPS (Wilson e Svendsen, 1972; Spurlock et al., 1997).

Apesar da constatação de que o desafio imunológico imposto pela aplicação de LPS nos leitões acarretou um estado catabólico protéico suficiente para alterar significativamente tais variáveis (proteínas totais e globulinas), ainda sim, a concentração de nutrientes das dietas foi suficiente para atender às necessidades concomitantes de crescimento e de síntese das proteínas de fase aguda e/ou

imunoglobulinas, sem causar prejuízos no desempenho dos leitões, conforme o observado também nos estudos conduzidos por Chiquieri et al., 2007 e Ledur et al., 2012.

O comportamento da principal proteína de fase aguda de suínos, a proteína C reativa (PCR), não indicou alterações ( $P < 0,05$ ) em relação ao processo inflamatório desencadeado pelo LPS após a primeira aplicação, o que também foi observado em outros estudos (Eckersall et al., 1996; Pereira, 2010; Ledur et al., 2012).

Somente foram verificadas diferenças ( $P < 0,05$ ) nos valores de PCR na quinta colheita de sangue, realizada três dias após a segunda aplicação de LPS. Os leitões que receberam dieta de alta densidade nutricional com beta-glucanos apresentaram valores de PCR maiores comparados com aqueles alimentados com dieta de alta densidade nutricional sem beta-glucanos, sugerindo que o maior aporte de ácido linoléico da dieta de alta densidade nutricional tenha resultado na maior síntese e liberação de prostaglandinas, produto do metabolismo do ácido araquidônico pela via das ciclo-oxigenases, que se caracteriza por ser um potente mediador inflamatório (Spurlock et al, 1997) e ainda, que o beta-glucano não foi eficiente na redução desse efeito pró-inflamatório.

Em contrapartida, na ausência de beta-glucanos, verificou-se efeito inverso nos valores de PCR de leitões que consumiram a dieta de menor densidade nutricional.

Os níveis de creatinina observados no presente estudo, além de enquadrarem-se nos níveis de normalidade para a espécie suína segundo Miller et al., 1961; Tumbleson et al., 1986; Friendship e Henry, 1992; Jain, 1996; Kaneko et al., 1997; Feldman et al., 2000; Tizard, 2002, comprovaram também que a função renal dos leitões não foi prejudicada pela dose administrada de LPS e que os mesmos não sofreram nenhum quadro de desidratação durante o experimento.

Não foram encontradas diferenças ( $P < 0,05$ ) nas dosagens de uréia plasmática em relação aos tratamentos, mas somente variação ( $P < 0,05$ ) ao longo dos períodos de colheita de sangue, contudo, sempre os valores se enquadraram na faixa de normalidade para a espécie suína, conforme Miller et al. (1961); Tumbleson et al. (1986); Friendship e Henry (1992); Jain (1996); Kaneko et al. (1997); Feldman et al. (2000); Tizard (2002), indicando que houve adequado aproveitamento de aminoácidos provenientes das dietas experimentais.

**Tabela 6.** Efeito dos níveis de beta-glucanos e da densidade nutricional das dietas sobre os parâmetros bioquímicos de leitões conforme os momentos de colheita de sangue.

Variável <sup>1</sup>	Dietas <sup>2</sup>	Momentos de Colheita <sup>3</sup>					
		Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Colheita 6
ALT (U L <sup>-1</sup> )	A0	23,11 ± 7,54 aAα	29,78 ± 5,91 bAα	28,22 ± 7,03 aAα	27,11 ± 7,36 aAα	32,78 ± 17,17 aAαβ	48,88 ± 16,53 aAβ
	Aβ	24,67 ± 6,08 aAα	23,33 ± 4,06 aAα	27,44 ± 11,66 aAα	32,78 ± 3,49 aAαβ	29,22 ± 8,58 aAα	46,56 ± 16,64 aAβ
	B0	18,33 ± 6,93 aAα	30,33 ± 5,52 aAα	30,00 ± 12,03 aAα	28,67 ± 7,97 aAα	25,00 ± 7,14 aAα	44,11 ± 12,28 aAβ
	Bβ	22,67 ± 6,12 aAα	25,33 ± 7,04 aAαβ	28,89 ± 9,52 aAαβ	29,33 ± 8,99 aAαβ	31,67 ± 8,22 aAαβ	38,67 ± 17,94 aAβ
FA (U L <sup>-1</sup> )	A0	461,22 ± 147,85 aAβγ	544,00 ± 128,11 aAγ	360,89 ± 69,21 aAαβ	390,00 ± 74,99 aAβ	246,44 ± 51,19 aAα	223,78 ± 74,15 aAα
	Aβ	477,33 ± 143,57 aAγ	543,78 ± 153,34 aAγ	354,22 ± 88,09 aAβ	371,00 ± 115,78 aAβ	224,22 ± 53,66 aAα	204,22 ± 42,02 aAα
	B0	446,11 ± 113,43 aAβ	546,68 ± 100,59 aAγ	372,56 ± 60,83 aAα	391,68 ± 96,33 aAβ	264,56 ± 50,21 aAα	207,11 ± 56,86 aAα
	Bβ	531,33 ± 124,45 aAγ	595,00 ± 73,93 aAγ	415,33 ± 84,71 aAβ	425,67 ± 78,63 aAβ	258,11 ± 60,53 aAα	211,56 ± 48,84 aAα
PT (g dL <sup>-1</sup> )	A0	5,98 ± 0,61 aAγ	5,13 ± 0,28 aAα	5,26 ± 0,28 aAαβ	5,12 ± 0,28 aAα	5,56 ± 0,36 aAβγ	5,70 ± 0,36 aAγ
	Aβ	5,68 ± 0,41 aAβγ	5,11 ± 0,31 aAα	5,47 ± 0,21 aAαβ	5,37 ± 0,37 aAαβ	5,74 ± 0,40 aAβγ	5,97 ± 0,51 aAγ
	B0	5,93 ± 0,45 aAβ	5,12 ± 0,33 aAα	5,30 ± 0,29 aAα	5,21 ± 0,31 aAα	5,79 ± 0,32 aAβ	6,10 ± 0,19 aBβ
	Bβ	5,81 ± 0,40 aAγ	4,94 ± 0,28 aAα	5,30 ± 0,15 aAαβγ	5,20 ± 0,14 aAαβ	5,50 ± 0,26 aAβγ	5,78 ± 0,36 aAγ
ALB (g dL <sup>-1</sup> )	A0	2,87 ± 0,25 aAαβ	2,99 ± 0,35 aAαβ	2,87 ± 0,29 aAαβ	2,83 ± 0,39 aAα	2,92 ± 0,39 aAαβ	3,17 ± 0,41 aAβ
	Aβ	2,69 ± 0,17 aAα	2,99 ± 0,27 aAαβ	2,89 ± 0,12 aAαβ	2,97 ± 0,15 aAαβ	3,11 ± 0,29 aAβγ	3,37 ± 0,35 aAγ
	B0	2,84 ± 0,19 aAα	2,98 ± 0,27 aAαβ	2,83 ± 0,22 aAα	2,84 ± 0,22 aAα	3,11 ± 0,37 aAαβ	3,28 ± 0,35 aAβ
	Bβ	2,78 ± 0,21 aAα	2,84 ± 0,25 aAα	2,73 ± 0,13 aAα	2,83 ± 0,17 aAα	2,92 ± 0,25 aAαβ	3,13 ± 0,29 aAβ
GLOB (g dL <sup>-1</sup> )	A0	3,11 ± 0,66 aAγ	2,14 ± 0,32 aAα	2,39 ± 0,16 aAαβ	2,29 ± 0,24 aAαβ	2,63 ± 0,15 aAβγ	2,53 ± 0,12 aAβ
	Aβ	2,99 ± 0,40 aAγ	2,12 ± 0,28 aAα	2,58 ± 0,17 bAβ	2,40 ± 0,27 aAαβ	2,63 ± 0,24 aAβ	2,60 ± 0,30 aAβ
	B0	3,09 ± 0,48 aAθ	2,14 ± 0,29 aAα	2,47 ± 0,23 aAαβγ	2,37 ± 0,22 aAαβ	2,68 ± 0,27 aAβγθ	2,82 ± 0,31 aBγθ
	Bβ	3,03 ± 0,35 aAγ	2,10 ± 0,12 aAα	2,57 ± 0,16 aAβ	2,37 ± 0,16 aAαβ	2,58 ± 0,27 aAβ	2,64 ± 0,39 aAβ
PCR (mg L <sup>-1</sup> )	A0	1,13 ± 0,56 aAα	1,90 ± 0,46 aAγ	1,38 ± 0,35 aAαβγ	1,78 ± 0,46 aAβγ	1,22 ± 0,16 aAα	1,34 ± 0,55 aAαβγ
	Aβ	1,83 ± 1,14 aAα	1,87 ± 0,26 aAα	1,46 ± 0,18 aAα	1,89 ± 0,56 aAα	1,60 ± 0,31 bAα	1,39 ± 0,50 aAα
	B0	1,39 ± 0,61 aAαβ	1,91 ± 0,48 aAγ	1,32 ± 0,43 aAαβ	1,66 ± 0,37 aAβγ	1,56 ± 0,42 aBαβγ	1,16 ± 0,27 aAα
	Bβ	1,89 ± 0,62 aAα	2,14 ± 0,60 aAα	1,79 ± 1,09 aAα	1,90 ± 0,87 aAα	1,56 ± 0,40 aAα	1,30 ± 0,49 aAα

Continua...

<sup>1</sup> ALT: alanina amino-transferase; FA: fosfatase alcalina; PT: proteínas totais; ALB: albuminas; GLOB: globulinas e PCR: proteína C reativa

<sup>2</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos ; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos

Letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ); letras gregas (Colheita 1 x Colheita 2 x Colheita 3 x Colheita 4 x Colheita 5 x Colheita 6)

<sup>3</sup> Média ± desvio padrão (n=9); teste de Bonferroni (P<0,05)

Variável	Dietas <sup>1</sup>	Momentos de Colheita <sup>2</sup>					
		Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4	Colheita 5	Colheita 6
Uréia (mg dL <sup>-1</sup> )	A0	22,00 (14,00; 33,00) aAαβ	24,00 (10,00; 28,00) aAαβ	14,00 (12,00; 20,00) aAα	20,00 (18,00; 26,00) aAαβ	28,00 (15,00; 39,00) aAβ	17,00 (12,00; 30,00) aAαβ
	Aβ	22,00 (16,00; 26,00) aAα	25,00 (14,00; 30,00) aAαβ	13,00 (12,00; 17,00) aAα	23,00 (18,00; 27,00) aAαβ	32,00 (23,00; 60,00) aAβ	23,00 (12,00; 31,00) aAαβ
	B0	21,00 (15,00; 32,00) aAαβ	27,00 (16,00; 37,00) aAαβ	16,00 (14,00; 19,00) aAα	21,00 (16,00; 26,00) aAαβ	33,00 (21,00; 278,00) aAβ	23,00 (16,00; 89,00) aAαβ
	Bβ	17,00 (13,00; 32,00) aAαβ	22,00 (12,00; 36,00) aAαβ	15,00 (12,00; 33,00) aAα	22,00 (16,00; 25,00) aAαβ	30,00 (16,00; 114,00) aAβ	26,00 (19,00; 32,00) aAαβ
Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	A0	1,05 (0,68; 1,11) aAβ	0,82 (0,70; 1,10) aAαβ	0,71 (0,61; 0,92) aAα	0,75 (0,65; 0,84) aAα	0,93 (0,79; 1,74) aAβ	0,96 (0,91; 1,18) aAβ
	Aβ	0,96 (0,82; 1,16) aAβ	0,80 (0,70; 1,00) aAαβ	0,69 (0,56; 0,80) aAα	0,70 (0,58; 0,81) aAα	0,94 (0,73; 1,90) aAβ	0,96 (0,78; 1,17) aAβ
	B0	0,95 (0,79; 1,15) aAβ	0,88 (0,78; 1,02) aAαβ	0,73 (0,65; 0,81) aAαβ	0,71 (0,61; 0,80) aAα	0,97 (0,89; 8,80) aAβ	1,02 (0,88; 2,43) aAβ
	Bβ	0,92 (0,79; 1,10) aAαβ	0,84 (0,76; 0,90) aAαβ	0,78 (0,62; 0,93) aAα	0,75 (0,65; 0,83) aAα	0,98 (0,83; 1,78) aAβ	0,96 (0,85; 1,15) aAβ

<sup>1</sup> A0: alta densidade nutricional sem β-glucanos; Aβ: alta densidade nutricional com β-glucanos; B0: baixa densidade nutricional sem β-glucanos e Bβ: baixa densidade nutricional com β-glucanos  
Letras minúsculas (A0 x Aβ; B0 x Bβ); letras maiúsculas (A0 x B0; Aβ x Bβ); letras gregas (Colheita 1 x Colheita 2 x Colheita 3 x Colheita 4 x Colheita 5 x Colheita 6)

<sup>2</sup> Mediana (valor mínimo; valor máximo) (n=9); teste de Dunn (P<0,05)



Embora a aplicação de LPS acarrete um quadro imediato de catabolismo protéico em resposta à inflamação aguda (Feingold e Grunfeld, 1992; Spurlock et al., 1997), a diminuição dos níveis de uréia três dias após a aplicação de LPS (terceira colheita de sangue) e sete dias após a aplicação de LPS (sexta colheita de sangue), sugere que os aminoácidos provenientes das dietas experimentais foram melhor aproveitados para atenderem às exigências para o crescimento dos leitões, bem como para a síntese celular e dos compostos nitrogenados exigidos para atender à ativação do sistema imune (Feingold e Grunfeld, 1992).

#### 4. Conclusões

As dietas de baixa densidade nutricional fornecidas foram suficientes para atender às necessidades de aminoácidos e energia para a síntese de anticorpos e proteínas de fase aguda. Os efeitos dos beta-glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* observados no hemograma e variáveis bioquímicas durante 38 dias de experimento não foram suficientes para comprovar sua ação imunomoduladora.

#### 5. Referências

- Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T., 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)-β-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 17, 1554–1560.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. *Official Methods of Analysis*. 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1141p.
- Baracos, V.E., Whitmore, W.T., Gale, R., 1987. The metabolic cost of fever. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 65, 1248-1254.
- Chiquieri, J., Soares, R.T.R.N., Hurtado Nery, V.L., Carvalho, E.C.Q., Costa, A.P.D., 2007. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 8, 97-104.
- Colditz, I.G., 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livestock Production Science* 75, 257–268.
- Curtis, J., Bourne, F.J., 1971. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochimica et Biophysica Acta* 236, 319-332.
- Dacie, J.D., Lewis, S.M., 1995. *Practical Hematology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, v.1.

- Eckersall, P.D., Saini, P.K., McComb, C., 1996. The acute phase response of acid soluble glycoprotein,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51, 377-385.
- Feingold, K.R., Grunfeld, C., 1992. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes* 41(Suppl. 2), 97-101.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. *Schalm's veterinary hematology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 417 p.
- Friendship, R. M., Henry, S.C., 1992. Cardiovascular system, hematology, and clinical chemistry. In: *Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'allaire, S., Taylor, D.J. Diseases of Swine*. 7<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 3-11.
- Guo, Y.M., Ali, R.A., Qureshi, M.A., 2003. The influence of  $\beta$ -glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 25, 461-472.
- Jain, N.C., 1996. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 5<sup>th</sup> ed., Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Johnson R.W., 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *Journal of Animal Science* 75, 1244–1255.
- Johnson, R.W., Borell, E.V., 1994. Lipopolysaccharide-induced sickness behavior in piglets is inhibited by pretreatment with indomethacin. *Journal of Animal Science* 72, 309–314.
- Johnson, R.W., Escobar, J., Webel, D.M., 2001. Nutrition and Immunology of Swine. In: *Lewis A.J. & Southern L.L. (Eds) Swine Nutrition*. 2.ed. Nebraska: CRC Press, 545-562.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 932p.
- Kinsella, J.E., Lokesh, B., Broughton, S., Whelan, J, 1990. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 6, 24-44.
- Klobasa, F., Butler, J.E., Werhahn, E., Habe, F., 1986. Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 11, 149-159.
- Le Dividich, J., Sève, B., 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domestic Animal Endocrinology* 19, 63-74.
- Ledur, V.S., Ribeiro, A.M.L., Kessler, A.M., Gianfelici, M.F., Vieira, M.M., Grandi, J., Machinsky, T.G., 2012. Respostas fisiológicas e de desempenho de leitões

- suplementados com  $\beta$ -glucanos e desafiados imunologicamente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64, 434-442.
- Miller, E.R., Ulrey, D.E., Ackermann, I., Schmidt, D.A., Luecke, R.W., Hoefler, J.A., 1961. Swine hematology from birth to maturity. II. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *Journal of Animal Science* 20, 890-897.
- Moraes, M.I., Ribeiro, A.M.L., Kessler, A.M., Ledur, V.S., Fischer, M.M., Vieira, M.M., 2010. Avaliação do ácido linoléico conjugado como nutriente imunomodulador em dietas de leitões recém-desmamados. 47<sup>a</sup> Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1-3.
- Nunes, P.P., Moreira, A.L., 2007. Fisiologia hepática. Material didático da Faculdade de Medicina da Universidade de Porto, 26p.
- Olson, E.J., Standing, J.E., Griego-Harper, N., Hoffman, O.A., Limper, A.H., 1996. Fungal  $\beta$ -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infection and Immunity* 64, 3548–3554.
- Pereira, L.M., 2010. Energia metabolizável para leitões na fase inicial submetidos à ativação do sistema imune. Dissertação de Mestrado, MG, Lavras: UFLA, 68p.
- Porter, P., Hill, I.R., 1970. Serological changes in immunoglobulins IgG, IgA and IgM and *Escherichia coli* antibodies in the Young pig. *Immunology*, 18, 565-573.
- Rakhshandeh, A., Lange, C.F.M., 2012. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal* 6, 305–310.
- Ribeiro, A.M.L.; Pinheiro, C.C., Gianfelice, M., 2008. Nutrientes que afetam a imunidade dos leitões. *Acta Scientiae Veterinariae* 36 (Supl. 1), s119-s124.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos (tabelas brasileiras). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 252p.
- SAS Institute. SAS/IML. User's Guide, version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 1999. 846p.
- Spurlock, M.E., Frank, G.R., Willis, G.M., Kuske, J.L., Cornelius, S.G., 1997. Effect of dietary energy source and immunological challenge on growth performance and immunological variables in growing pigs. *Journal of Animal Science* 75, 720-726.
- Stuyven, E., Broeck, W.V., Nauwynck, H., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2010. Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan Macrogard fails to enhance the mucosal immune response following oral F4 fimbrial immunisation in gnotobiotic pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137, 291-297.

- Tizard, I.R., 2002. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6<sup>th</sup> ed. São Paulo: Roca, 532p.
- Tumbleson, M.E., Schmidt, D.A., Scholl, E., 1986. Hematology and clinical chemistry. In: LEMAN, A.D., STRAW, B.E., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLL, E. *Diseases of swine*. 6<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 27-44.
- Tzianabos, A.O., 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 523–533.
- Van Heugten, E., Spears, J.W., Coffey, M.T., 1994. The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. *Journal of Animal Science* 72, 2661.
- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. *Physiology & Behaviour* 94, 276-284.
- Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H., 1997. Time course of increased plasma cytokines and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 75, 1514–1520.
- Wilson, M.R., Svendsen, J., 1972. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Serum gamma globulin levels, indirect hemagglutinating antibody titres and bactericidal activity against *E. coli* in pigs up to five weeks of age. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 36, 38-43.
- Williams, D.L., 1997. Overview of (1→3)- $\beta$ -D-glucan immunobiology. *Mediators of Inflammation* 6, 247–250.
- Wood, P. *Understanding Immunology*. 2006, 2<sup>nd</sup> ed. Pearson Education Limited: England, 315p.
- Young, S., Ye, J., Frazer, D.G., Shi, X., Castranova, V., 2001. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in 1→3- $\beta$ -glucan (Zymosan)-activated macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 20781–20787.
- Zekovic, D.B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M.M., Jakovljevic, D., Moran, C.A., 2005. Natural and modified (1→3)- $\beta$ -D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 205–230.

## **ANEXO 1**

**Tabela 7.** Valores de referência para os parâmetros eritroleucométricos e bioquímicos de suínos<sup>1</sup>.

Parâmetros	Valores
Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	5,0 – 8,0
Hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ )	10, 0 – 16,0
Hematócrito (%)	32,0 – 50,0
HCM <sup>2</sup> (pg)	16,6 – 22,0
VCM <sup>3</sup> (fL)	42,0 – 62,0
CHCM <sup>4</sup> (%)	30,0 – 34,0
Leucócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	11,0 – 22,0
Bastonetes (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	0,0 – 800
Neutrófilos (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	3.200 – 10.000
Linfócitos (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	4.000 – 13.000
Monócitos (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	100 – 2.500
Eosinófilos (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	50 – 2.000
Basófilos (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	0,0 – 400
Segmentados (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	2.500 – 23.000
Plaquetas (céls $\mu\text{L}^{-1}$ )	200.000 – 663.000
Imunoglobulina G ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	1.700 – 2.900
Imunoglobulina M ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	100 – 500
Uréia ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	21,0 – 64,0
Creatinina ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	1,0 – 2,70
Proteínas totais ( $\text{g dL}^{-1}$ )	2,25 – 8,40
Albuminas ( $\text{g dL}^{-1}$ )	0,36 – 4,30
Globulinas ( $\text{g dL}$ )	1,75 - 5,86
Alanina amino-transferase ( $\text{U.I. L}^{-1}$ )	21,0 – 94,0
Fosfatase alcalina ( $\text{U.I. L}^{-1}$ )	118 – 891

<sup>1</sup> Adaptado de Miller et al. (1961); Tumbleson et al. (1986); Friendship & Henry, 1992; Jain, 1996; Kaneko et al. (1997); Feldman et al. (2000); Tizard (2002).

<sup>2</sup> HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

<sup>3</sup> VCM: Volume Corpuscular Médio

<sup>4</sup> CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

## **CAPÍTULO 4**

## IMPLICAÇÕES

Nesta pesquisa levantou-se a hipótese da ação imunomoduladora dos beta-glucanos administrados em dietas com diferentes densidades nutricionais sobre o desempenho e parâmetros sanguíneos, imunológicos, bioquímicos, morfométricos intestinais e peso de órgãos de leitões.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem ação dos beta-glucanos na resposta imune são necessários novos estudos para comprovar seus efeitos estimulatórios e regulatórios visando à melhoria em longo prazo da resistência dos leitões aos patógenos prejudiciais ao seu potencial produtivo.

Os dados desta e de outras pesquisas, contudo, não dão suporte científico que justifique o uso deste aditivo em dietas para leitões desmamados. As diferenças nos resultados das pesquisas provavelmente estão relacionadas com a idade, condições de criação e nutricionais dos animais, dosagens usadas nos experimentos, duração do período experimental e às fontes dos beta-glucanos utilizados. Além disso, o próprio método de extração pode determinar diferentes respostas entre os vários beta-glucanos isolados da mesma fonte.

Com relação às densidades nutricionais das dietas avaliadas neste estudo, as de baixa densidade nutricional foram suficientes para atender às exigências de aminoácidos e energia para a síntese de anticorpos e proteínas de fase aguda, bem como para o crescimento dos leitões.