

Maria Aparecida Martins Rodrigues

Resposta imune e modificações morfológicas de vilosidades intestinais de leitões suplementados com probióticos.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Maria Aparecida Martins Rodrigues**, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de julho de 2002.

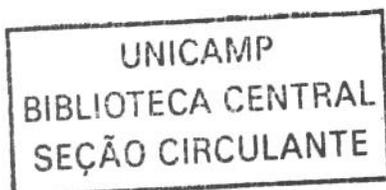
Campinas, 30 de julho de 2002


Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez
Blazquez
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Campinas

2002



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Maria Aparecida Martins Rodrigues

Resposta imune e modificações morfológicas de vilosidades intestinais de leitões suplementados com probióticos.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Nutrição Básica e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

Campinas

2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R618r Rodrigues, Maria aparecida Martins
Resposta imune e modificações morfológicas de vilosidades
intestinais de leitões suplementados com probióticos / Maria
Aparecida Martins Rodrigues. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Francisco Javier Hernandez Blazquez
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Probióticos. 2.Sistema imune. 3.Leitões. I.Hernandez
Blazquez, Francisco Javier. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em ____/____/2002, considerou a candidata aprovada.


Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

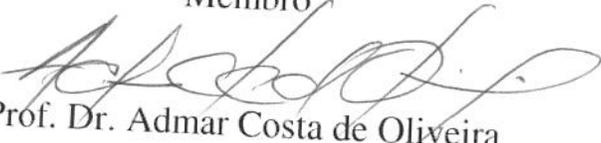
Orientador


Profa. Dr.^a Sarah Arana

Membro


Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

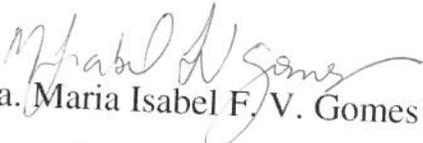
Membro


Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Membro

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Membro


Profa. Dra. Maria Isabel F. V. Gomes

Membro

Profa. Dra. Jacinta Diva Ferrugem Gomes

Membro

Ao meu filho Alex, e aos familiares, por todo
apoio e dedicação em todas as horas.

Às amigas Ana Lourdes Neves Gândara e
Cláudia Breviário, pela amizade sincera.

Ao professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, agradeço pela orientação e, principalmente, pela confiança na realização deste trabalho.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), representada pelos docentes e técnicos administrativos.

À Deise Aparecida de Oliveira Silva e Maria Aparecida de Souza, técnicos administrativos do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio técnico.

Aos professores do Laboratório de Histologia e Embriologia, da Universidade Federal de Uberlândia, Profa. Dra. Eloisa Amália Ferro, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, Prof. Dr. Marco Aurélio Martins Rodrigues, e ao Rui Silva, técnico em histologia, pela permissão de uso do laboratório.

Ao veterinário Régis Kamimura, proprietário da Fazenda Douradinho, pelo fornecimento do local e dos animais para o experimento.

À Profa. Dra. Denise Garcia de Santana, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo auxílio nos métodos estatísticos.

Ao Programa Institucional de Capacitação de Docentes (CAPES – PICD) pelo auxílio concedido à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Gomes Bento, professora substituta da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo seu ótimo trabalho com nossos alunos.

Agradeço em especial a Walter Terreri pela digitação deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Probióticos – definição e características.....	4
2.2 Probióticos e antibióticos – saúde pública e ética	5
2.3 Microrganismos probióticos – modo de ação	7
2.4 Distribuição do tecido linfóide e produção de imunoglobulinas na mucosa intestinal	12
2.5 Estratégia para avaliação da atividade do sistema imune e do sistema digestivo	19
2.6 Emprego dos probióticos na dieta de suínos – manejo	21
2.7 Adesão – colonização do tubo digestivo (esôfago, estômago e intestinos) por <i>Lactobacillus</i> e <i>E. coli</i>	26
2.8 Aspectos que dizem respeito à viabilidade e aos probióticos inativados	30
2.9 O estresse após o desmame	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35

3.1 Animais	35
3.2 Probióticos	35
3.3 Tratamentos	36
3.4 Análise da resposta imune	39
3.4.1 Contagem de coliformes nas fezes	39
3.4.2 Imuno-histoquímica e identificação de células IgA-positivas.....	42
3.4.2.1 Processamento histológico	42
3.4.2.2 Método histoquímico	40
3.4.3 Dosagem de IgA por ELISA	44
3.5 Morfologia das vilosidades intestinais	46
3.6 Análise estatística	48
3.7 Documentação fotográfica	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Análise da resposta imune	49
4.1.1 Contagem de coliformes nas fezes	49
4.1.2 Imuno-histoquímica e identificação de células IgA-positivas ..	51
4.1.3 Dosagem de IgA por ELISA	52
4.2 Análise morfológica das vilosidades intestinais	54
5 DISCUSSÃO	56
5.1 Análise da resposta imune	56

5.1.1	Contagem de coliformes nas fezes	56
5.1.2	Imuno-histoquímica e identificação de células secretoras de IgA	59
5.1.3	Dosagem de IgA por ELISA	61
5.2	Análise morfológica das vilosidades intestinais	63
6	CONCLUSÃO	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8	APÊNDICES	89
8.1	Medidas de altura (AV) e largura (L) das vilosidades e profundidade das criptas (PC) no duodeno	89
8.2	Medidas de altura (AV) e largura (L) das vilosidades e profundidade das criptas (PC) no jejuno	92
8.3	Medidas de altura (AV) e largura (L) das vilosidades e profundidade das criptas (PC) no íleo	95

RESUMO

Dois produtos comerciais distintos foram utilizados para avaliar os efeitos dos probióticos quanto à imunoestimulação, proteção contra as diarreias e às possíveis alterações na mucosa intestinal de leitões. Um deles veicula cepas de *Lactobacillus acidophilus* inativadas; o outro é composto por cultivos mistos de *L. acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum*, viáveis.

Os animais foram separados em 3 grupos: 1 – grupo de controle; 2 – grupo tratado com probiótico inativado, Grofactor; e 3 – grupo tratado com probiótico composto por células viáveis, Biobac. Os grupos foram tratados durante 30 dias, com 2 doses semanais, exceto o grupo de controle, que recebeu leite materno, ração e água. Ao final do período, foi coletado sangue de todos os animais avaliados para verificação dos níveis de IgA no soro pelo método de ELISA. De cada grupo foram sacrificados 3 animais e procedeu-se à coleta de fragmentos do intestino delgado e linfonodos mesentéricos para estudo morfológico das vilosidades intestinais e identificação das células IgA-positivas.

Os animais que receberam o probiótico com células viáveis (Biobac) apresentaram o teor de IgA no soro mais elevado que o grupo suplementado com bactérias inativadas (Grofactor) e o grupo controle.

A altura das vilosidades intestinais também foi maior no grupo que recebeu bactérias viáveis durante o período de aleitamento.

Esses dados sugerem que a adição de probióticos ativos na dieta dos leitões recém-nascidos e/ou após o desmame melhora o desempenho e a saúde dos animais.

ABSTRACT

The immunostimulant and antidiarrheic role of two probiotic products were evaluated. Their effect in the intestinal mucosa of piglets was also investigated. One of the products contains inactivated strains of *Lactobacillus acidophilus* while the other one is composed by live mixed cultures of *L. acidophilus*, *Enterococcus faecium*, and *Bifidobacterium bifidum* bacteria. Three groups of animals were created: 1 – control group; 2 – animals that received the inactivated probiotic product; 3 – animals that received the probiotic product with live cells. The products were given twice weekly for 30 days with the exception of the control group. At the end of the experimental period, blood samples were taken and the IgA serum levels were measured by ELISA method. Three animals from each group were sacrificed and fragments of the small intestine and mesenteric lymphonodes were microscopically examined to investigate the size of intestinal glands and villusities and the presence of IgA – positive cells. The animals that received live cells showed higher IgA serum levels, longer intestinal villusities and more IgA – positive cells in the lymphonodes and intestinal mucosa than the other animals. Their body weight was also higher. These data suggest that live probiotics, when given to newborn post – weaning piglets, are more efficient than inactivated probiotics in inducing intestinal changes that help to improve the health and performance of swine.

1 INTRODUÇÃO

O termo probiótico define os microrganismos viáveis que compõem os mais diversificados suplementos alimentares (microingredientes de alimento completo – ração), os quais afetam benéficamente o animal por manter o equilíbrio microbiano do trato gastrintestinal. Recentemente, tem-se incluído entre os probióticos, os alimentos providos de culturas simples ou mistas, cujos mecanismos não são afetados pelas variáveis da microflora intestinal (OUWEHAND et al., 1999).

A viabilidade dos microrganismos probióticos é condição necessária para que ocorra adesão aos sítios receptores localizados na mucosa intestinal, porém existem estudos feitos com cepas inativadas que mostram seus efeitos na inibição de bactérias e vírus causadores de diarreias em suínos (COCONIER et al., 1993).

A suinocultura é hoje o setor que produz a carne mais consumida em todo mundo, porém no Brasil o consumo ainda é menor que a carne bovina e de frango. Esse setor demanda grande desenvolvimento tecnológico para transformar a menor quantidade possível de grãos e outros alimentos em proteína de excelente qualidade. Um sistema de produção de suínos pode ser qualificado como sustentável se enfatizar principalmente: 1- a qualidade de

vida dos produtores e dos consumidores; 2- o ambiente como fonte de recursos; 3- a qualidade da carne produzida e 4- a rentabilidade do sistema. Embora o uso dos probióticos venha ocorrendo há décadas, em suínos as respostas são variadas. Se os resultados obtidos forem insatisfatórios, devem ser pesquisadas as causas, as quais podem ser a baixa viabilidade das culturas inseridas nos produtos, a insuficiência das dosagens e a interação com outros suplementos administrados à dieta (LIMA, 1999).

Pelo exposto acima, fica clara a importância da suplementação da dieta de suínos com probióticos principalmente na fase pós-desmame e ainda quando jovens. Esta importância é reforçada em virtude do uso, em doses subclínicas, de antibióticos como promotores de crescimento, contrariando a opinião pública, em especial a europeia. A oferta de probióticos, embora abundante em países da Europa, América do Norte e Japão, ainda é considerada pequena no mercado brasileiro, porém com tendência para aumentar o uso.

Numerosos trabalhos são citados na revisão da literatura enfocando os efeitos dos probióticos quanto ao crescimento e ganho de peso, as modificações morfológicas do trato gastrintestinal e a capacidade de adesão das várias cepas empregadas como probiótico. Porém, investigações mais detalhadas quanto aos efeitos dos vários tipos de probióticos comercializados

atualmente empregados na suinocultura nacional, com estudo criterioso quando aos tipos de cepas empregados, bem como a quantidade das mesmas nestes produtos, ainda se fazem necessários, uma vez que para a maioria dos produtos tais estudos não foram ainda realizados.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune, e as modificações morfológicas no trato gastrintestinal de suínos suplementados com dois tipos distintos de probióticos, freqüentemente empregados na suinocultura, um com bactérias viáveis e outro com bactérias inativadas. A produção de IgA no soro dos leitões foi avaliada, e as células IgA-positivas foram mostradas nos linfonodos mesentéricos e também nos cortes de intestino delgado. Ao mesmo tempo, as vilosidades intestinais foram observadas quanto às possíveis mudanças após os tratamentos.

Espera-se assim, contribuir para uma orientação segura no emprego deste tipo de suplementação, no que tange às cepas utilizadas e quantidades empregadas na composição do probiótico, bem como na dose fornecida aos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS – DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS

Os probióticos são definidos como microingredientes compostos por bactérias e/ou leveduras específicas e viáveis que contribuem benéficamente para o equilíbrio da flora intestinal (FULLER, 1989; SMITH, 1991). São considerados probióticos os produtos que contêm microrganismos produtores de ácido láctico, podendo ser administrados de forma integral ou junto com os alimentos (MINNEY, 1991; MONTES & PUGH, 1993).

Caracteriza-se como microingrediente toda substância intencionalmente adicionada aos produtos destinados à alimentação animal com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades desejáveis e suprimir as indesejáveis (Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 1998). Fazem parte deste grupo os acidificantes, adsorventes, aglutinantes, anticoccidianos, antifúngicos, antioxidantes, aromatizantes, palatilizantes, conservantes, corantes, enzimas, pigmentantes, promotores de crescimento e os probióticos. Os antibióticos incorporados aos alimentos completos (rações) como promotores de crescimento, já estão sendo controlados e fiscalizados pelo Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes, com base na

Portaria DAS/MA N^o 110 de 26 de agosto de 1996. Nesse sentido, os principais benefícios deste controle para a saúde pública são: evitar os resíduos na carne, ovos e leite; diminuir a resistência dos agentes patogênicos e reduzir a contaminação do meio ambiente por eliminação dos dejetos dos animais (SONCINI, 1999). Além disso, fornece informações mais objetivas ao consumidor, o qual está cada vez mais empenhado em conhecer a qualidade e procedência dos produtos oferecidos no mercado. Começam então a surgir alternativas para substituição dos microingredientes de alimentos (aditivos), como os probióticos atuando como promotores de crescimento (FULLER, 1989).

2.2 PROBIÓTICOS E ANTIBIÓTICOS – SAÚDE PÚBLICA E ÉTICA

De acordo com SEVERO (1999), a segurança alimentar envolve a saúde pública e a ética, dois aspectos importantes, relacionados com a presença de resíduos antimicrobianos na carne. O bem estar e a saúde dos seres humanos depende, entre outros fatores, da qualidade do alimento consumido. Do ponto de vista ético, o consumidor deve estar seguro dessa qualidade, cuja responsabilidade se estende do produtor, cuidando da saúde dos animais, até o

distribuidor do alimento. Nem todas as drogas e compostos químicos que podem contaminar os animais deixam resíduos nocivos à saúde. Para tanto existe um limite máximo de resíduo (LMR) permitido nos alimentos, sem prejuízo da integridade orgânica dos seres humanos e dos animais. Para PAIGE et al. (1999), a presença de resíduos acima do que é permitido provoca mudanças na flora intestinal natural, alergias e outros problemas metabólicos. Por isso, a criação de animais destinados à produção de carne deve ser feita sem adição dos agentes antimicrobianos ou antibióticos à ração, cujo efeito pode ser o aumento da resistência bacteriana, a qual afeta os seres humanos prejudicando sua saúde (WITTE et al., 2000).

Os probióticos são classificados como microingredientes profiláticos devido a seu modo de ação específico (BUTOLO, 1998). Desse modo, para fazer parte desta classe, devem ser adicionados na alimentação animal obedecendo às seguintes normas: 1-melhorar o desempenho de maneira efetiva e econômica; 2-ser atuantes em pequenas dosagens; 3-não apresentar resistência cruzada; 4-manter a flora gastrintestinal normal; 5-não ser tóxicos para os animais e para o homem nas dosagens recomendadas, não podendo ser mutagênico ou carcinogênico e 6-não causar efeitos deletérios ao meio ambiente. O uso dos probióticos na produção animal tem sua origem no emprego indiscriminado dos antibióticos promotores de crescimento no

alimento completo, tornando-se uma alternativa para viabilizar o crescimento dos animais de forma mais natural, além de auxiliar no combate ao estresse pós desmame. O estresse produz efeitos na microflora intestinal, reduz o número de microrganismos anaeróbicos e diminui a produção de muco, uma fonte de energia necessária ao crescimento dos mesmos.

2.3 – MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS – MODO DE AÇÃO

De acordo com SMITH (1991), a microflora normal do trato intestinal se caracteriza por apresentar 90% de bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido láctico como os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium sp*, *Enterococcus* e anaeróbias obrigatórias (*Bacteroides*, *Eubacterium*), e 10% de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Proteus sp*, num total de 10^{14} bactérias por grama de digesta. Os mecanismos de ação dos probióticos estão basicamente relacionados à produção de substâncias antibióticas, competição pelos receptores ou sítios de adesão localizados na mucosa intestinal e pelos nutrientes disponíveis, além de possuírem capacidade de imunoestimulação. O mesmo autor ainda relata que os produtos resultantes do metabolismo dos probióticos são em

geral ácidos, como o acético, o fórmico e o láctico, os quais reduzem o pH intestinal. Essa modificação do pH é desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos Gram negativos que fazem parte da microflora intestinal normal e que são incorporados durante os processos de distúrbios entéricos. Dessa forma, as bactérias patogênicas são capazes de aderir às células epiteliais do intestino delgado e se multiplicar. Os lactobacilos, no entanto, podem reduzir e prevenir este efeito através da competição pelos sítios de adesão localizados na mucosa intestinal, formando assim um biofilme protetor (SPENCER & CHESSON, 1994).

Os probióticos devem ser constituídos por microrganismos que sejam habitantes naturais dos intestinos para que possam desempenhar suas funções de forma adequada e eficiente. Além disso, o número de células viáveis por grama de produto deve ser elevado. Finalmente, após a ingestão, a cultura deve crescer e produzir ácidos em pouco tempo. Geralmente, *Lactobacillus* são extremamente tolerantes à redução de pH, porém a capacidade de se implantar na mucosa intestinal depende das condições de resistência ao pH do estômago e principalmente da secreção de sais biliares no duodeno. Para se obter um bom resultado, a dose mínima de produto a ser ingerido deve ser de 10^8 a 10^{10} ufc/g/animal/dia (MONTES & PUGH, 1993).

Para FULLER (1989), um produto denominado probiótico deve apresentar número elevado de células viáveis, ser capaz de sobreviver e se desenvolver no trato gastrointestinal, resistir a valores baixos de pH e às adversidades intestinais, além de estimular a imunidade e de resistir à ação dos sais biliares.

As bactérias lácticas são muito utilizadas na elaboração de leites fermentados e outros produtos alimentares, exercendo funções antagonistas sobre muitos organismos patogênicos através do ácido lático e a redução do pH. Além disso, são microrganismos produtores de substâncias inibidoras, como as bacteriocinas, ou seja, compostos antimicrobianos com efeito bactericida. Por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* produz a bacteriocina acidocina B, com ação inibidora específica para *Clostridium sporogenes* (MITAL & GARG, 1995).

O *Lactobacillus acidophilus*, quando incorporado à dieta de camundongos na quantidade de 10^{10} ufc/dia reduz a atividade das enzimas azaredutase, nitroredutase e β -glicuronidase do intestino grosso, responsáveis pelo aumento da incidência de câncer no cólon. Portanto, o *L. acidophilus* tem a função de diminuir a capacidade de ação destas enzimas e, conseqüentemente, modificar as chances de desenvolvimento de câncer de cólon (MITAL & GARG, 1995).

Além de bactérias, os fungos, as leveduras e as algas têm sido usados na alimentação humana e animal como fontes de vitaminas e proteínas. As leveduras, como o *Saccharomyces cerevisiae*, possuem efeitos antagônicos aos microrganismos patogênicos e aumentam a atividade enzimática específica do epitélio intestinal. Por não serem habitantes naturais do trato gastrintestinal, suas células não aderem ao epitélio, multiplicam-se pouco e são carregadas com o bolo alimentar. Além disso, funcionam como bioprotetores, diminuindo a ação dos microrganismos patogênicos na mucosa intestinal. Em geral as leveduras termolisadas são usadas na dieta dos monogástricos, sendo consideradas boas fontes de aminoácidos, vitaminas do complexo B, minerais e nucleotídeos (BUTOLO, 2001).

Os mecanismos de adesão do *Lactobacillus acidophilus* têm características próprias, ocorrendo de forma específica ou não-específica. A competição pelos nutrientes disponíveis na luz intestinal faz com que os microrganismos patogênicos não se desenvolvam. *Lactobacillus acidophilus* corresponde a um bacilo Gram positivo que requer, para seu crescimento, determinadas vitaminas hidrossolúveis do complexo B como pantotenato de cálcio (B5), ácido fólico (B9), niacina (B3) e riboflavina (B2) e pode fazer parte dos probióticos simples ou mistos (BROOKER & FULLER, 1975). O probiótico caracterizado como misto é aquele constituído por diversas cepas

conjuntas, como *Enterococcus faecium* e o *Saccharomyces cerevisiae*. O *E. faecium*, que pertencia anteriormente ao gênero *Streptococcus*, cresce em meios com 6% de NaCl e pH 9,6. A levedura *S. cerevisiae*, possui células alongadas ou ovaladas de 6-7 μm de diâmetro. É muito utilizada nos processos industriais de fabricação de produtos fermentados, agindo na produção de metabólitos nutritivos no trato digestivo, melhorando o desenvolvimento de animais assim suplementados (BROCK, 1994). De acordo com JIN et al. (2000), mais de 60% dos probióticos comercializados contém cepas de enterococos. O *Enterococcus faecium* 18C23 é capaz de inibir as cepas de *E. coli* K88ac e K88MB no muco intestinal de leitões, com adesão específica à mucosa ao invés dos patogênicos, isso quando inoculado na quantidade de 10^9 ufc/ml.

As características e o modo de ação dos probióticos foram também discutidos no trabalho de VERDES (1996), onde camundongos foram alimentados com suplemento à base de *L. casei* durante 2, 5 e 7 dias, com a finalidade de induzir o aumento das imunoglobulinas, e suínos recém-nascidos alimentados com suplemento de *L. acidophilus* ou *Enterococcus faecium* para prevenir infecções causadas por *E. coli*. Em ambos os experimentos os resultados demonstraram o aumento da proteção às infecções

intestinais pelo nível elevado de IgA e pela ativação das células imunocompetentes da lâmina própria intestinal.

Estudos com bactérias lácticas mostraram que o mecanismo de ação dos probióticos por imunoestimulação é um dos mais eficientes. É sabido que a administração de *L. acidophilus* associado ao *Streptococcus thermophilus* altera a atividade fagocitária e enzimática dos macrófagos peritonias, acelerando assim as funções do sistema reticuloendotelial. Desta forma, a atividade dos probióticos depende de um complexo formado por fatores ambientais, especificidade e condições nutricionais e físicas do hospedeiro (MONTES & PUGH, 1993).

2.4 DISTRIBUIÇÃO DO TECIDO LINFÓIDE E PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS NA MUCOSA INTESTINAL

Nos suínos, todos os segmentos do intestino delgado contêm células linfóides logo após o nascimento. Nos primeiros dias de vida, além dos anticorpos maternos, os leucócitos estão presentes no epitélio. Nesses animais, onde não ocorre passagem de imunoglobulinas pela placenta (epiteliocorial), o colostro é o veículo primário das mesmas. Os linfócitos no intestino delgado

se distribuem pela mucosa, localizando-se no interior das células M, entre as células epiteliais e na lâmina própria (TZIARD, 1998).

As placas de Peyer, estruturas situadas na lâmina própria ou na submucosa do íleo, são barreiras importantes para vários antígenos como vírus, protozoários, e bactérias, inclusive os de origem alimentar. São funcionalmente heterogêneas, constituídas por massas de linfócitos dispostas em folículos e cobertas por epitélio, onde existem células especializadas na absorção de antígenos particulados do lúmen intestinal, as células M (células de microenvoltório). Os antígenos que penetram através dos enterócitos são rapidamente degradados pelos lisossomos; já os que atravessam as células M, permanecem intactos e são apresentados aos linfócitos intraepiteliais destas células, ou podem passar pelo espaço intercelular e se localizarem no fluido intestinal (Figura 1). A partir daí são transportados aos linfócitos drenantes (TIZARD, 1998).

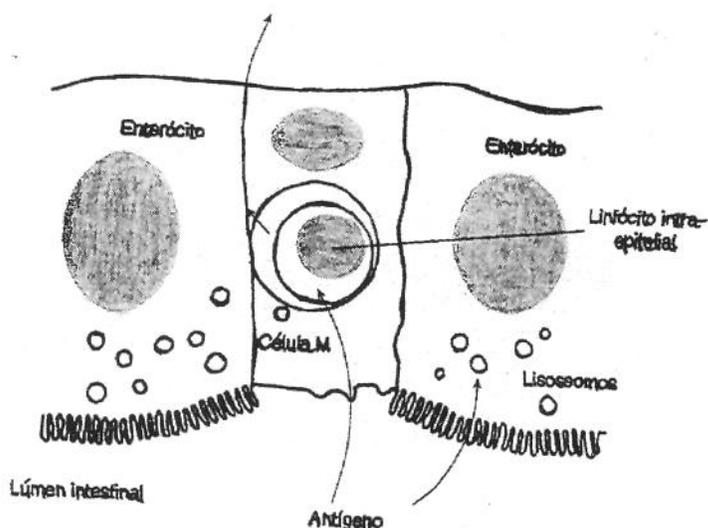


Figura 1. Papel das células M como células processadoras de antígenos na parede intestinal, onde os antígenos que entram nos enterócitos são em geral rapidamente degradados nos lisossomos, não sendo degradados os que entram nas células M. Os antígenos podem ser apresentados diretamente aos linfócitos intra-epiteliais dentro das células M ou, alternativamente, passam ao longo do espaço intercelular para o fluido tecidual. A partir daí, os antígenos são transportados para os linfonodos drenantes.

Apesar de haver grande número de linfócitos, a maior parte da IgA é produzida nos nódulos linfóides difusos e pelos plasmócitos isolados. As células IgA-positivas diferenciam-se nas placas de Peyer e migram para os locais efetores, como os linfonodos mesentéricos. Nos suínos, 90% das células que contêm imunoglobulinas na lâmina própria intestinal contêm IgA, cuja concentração no soro desses animais é de 200 mg/dl (BRANDTZAEG et al., 1989). A parede intestinal contém células T e B que respondem aos antígenos dividindo-se e diferenciando-se. As células B diferenciam-se em plasmócitos, os quais migram para linfonodos regionais. As células Ta2 encontradas nos

tecidos superficiais secretam, após estímulo, uma mistura de citocinas que estimulam preferencialmente a síntese de IgA e IgE. O fator transformador de crescimento β (FCT- β) dá início dessa forma a produção de IgA, mediada pela interleucina - 6 (IL-6), além de outras, para a diferenciação dos plasmócitos produtores de IgA (Figura 2).

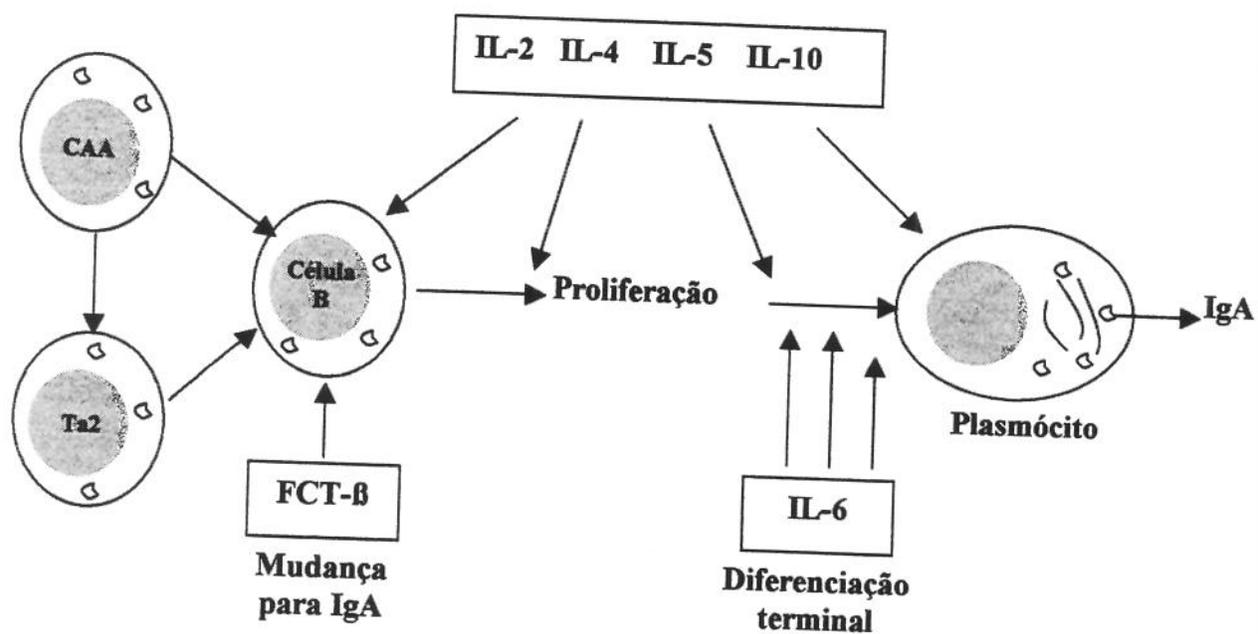


Figura 2. Controle da produção de IgA. O FCT- β é primariamente responsável pela mudança de IgM para IgA. A diferenciação terminal dos plasmócitos produtores de IgA é predominantemente mediada pela IL-6. Outras citocinas também são importantes no processo.

Após ser secretada pelos plasmócitos, a IgA se conjuga ao receptor polimérico de imunoglobulinas (RIgp) na superfície basal das células epiteliais sendo o complexo endocitado (BRANDTZAEG et al., 1989; BIANCI et al., 1992). Para atingir o lúmen intestinal, ocorre fusão com a membrana plasmática, onde enzimas proteolíticas promovem clivagem da porção extracelular do receptor e liberam assim a IgA secretora (IgAS), que funciona como proteção à mucosa intestinal (Figura 3).

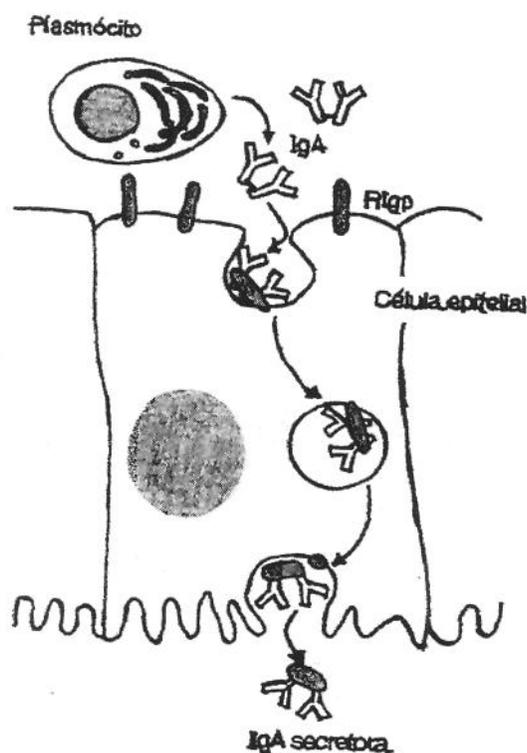


Figura 3. A IgA é secretada pelos plasmócitos da mucosa e se conjuga com receptores (RIgp) na superfície interior dos enterócitos intestinais. A IgA conjugada é absorvida pelos enterócitos e transportada em vesículas para superfície celular. Uma vez no lúmen intestinal, o RIgp é clivado a partir da célula e permanece conjugado com a IgA. Nesse sentido, ele é chamado de componente secretor e serve para proteger a IgA de uma degradação.

Após a penetração do microrganismo por via oral, ocorre sensibilização, onde os linfócitos B e os plasmócitos abandonam as placas de Peyer indo até os gânglios mesentéricos. Dessa forma, parte dos linfócitos B se transformam em plasmócitos produtores de IgA (DI NOLA *et al.*, 1991). A migração das células linfóides para o interior da lâmina própria a partir da via sanguínea, ocorre na cripta da mucosa, onde há aderência específica de IgA na membrana epitelial (ROTHKOTTER *et al.*, 1999). Assim, a imunidade intestinal deve-se à migração de linfócitos T e B do tecido linfóide, como a placa de Peyer, através da linfa e sangue periférico, para os linfonodos regionais e para as criptas intestinais (ou de Lieberkühn), que são as estruturas responsáveis pelo transporte de imunoglobulinas para o lumen intestinal.

De acordo com a Equipe Técnica Biotecnal (1998), o ácido láctico produzido pelas bactérias administradas por via oral aumenta a imunidade da mucosa intestinal bem como a produção de imunoglobulina A (IgA), em resposta à ação de microrganismos patogênicos. A IgA é sintetizada pelos plasmócitos no tecido linfóide associado ao intestino através da estimulação antigênica local, sendo parcialmente difundida para a luz intestinal. O modo de ação mais importante da IgA é o de impedir a aderência de bactérias e vírus a superfícies epiteliais. O antígeno K 88 é uma estrutura poliíide, por meio do qual a *E. coli* se liga às células epiteliais do intestino, impedindo sua

expulsão e permitindo que proliferem e que produzam enterotoxinas. Neste caso a IgA tem a função de agir sobre o antígeno, inibindo a adesão dessa bactéria à mucosa intestinal. Assim as bactérias lácticas, ao serem administradas por via oral, determinam imunidade específica no trato gastrointestinal da seguinte forma: a bactéria penetrando pela cavidade oral funciona como um antígeno, onde os linfócitos associados à mucosa intestinal liberam citocinas e anticorpos IgA.

A IgA secretora (IgAS) é resistente às enzimas tripsina, quimotripsina e papaína. Sua função primária na superfície da mucosa intestinal consiste em bloquear a adesão de bactérias enteropatogênicas aos enterócitos, como também metabolizar as enterotoxinas bacterianas e os vírus. Além da ação aglutinante sobre os microrganismos patogênicos, favorece sua eliminação, através do peristaltismo intestinal e, conseqüentemente, combate a colibacilose em suínos, com auxílio de outras células de defesa como os leucócitos, monócitos, macrófagos e linfócitos no intestino. A ingestão do colostro pelos leitões faz com que os anticorpos IgM e IgG estejam presentes em maior quantidade, sendo a IgA predominante no leite pós-colostro (SALMON, 1999).

Os possíveis modos de ação dos probióticos são a redução no número de microrganismos intestinais indesejáveis; a manutenção da flora normal do

intestino; imunoestimulação; a regulação da motilidade intestinal e a hidrólise da lactose, o que facilita a digestão da mesma.

O primeiro mecanismo está associado à elaboração de bacteriocinas pelas bactérias lácticas, as quais competem com os microrganismos patogênicos pelos nutrientes e pelos sítios de adesão na mucosa intestinal. A capacidade de imunoestimulação implica no aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos do trato gastrintestinal (HOSE & SOZZI, 1991; DUGAS et al., 1999). Em ratos foram observados efeitos como redução nos níveis de colesterol no soro e prevenção do câncer de colón; em humanos a osteoporose pode ser reduzida com o uso continuado dos probióticos (MITAL & GARG, 1995).

2.5 ESTRATÉGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA IMUNE E DO SISTEMA DIGESTIVO

Para a avaliar o estado do sistema imune frente à ação de patógenos intestinais e/ou mediante a suplementação probiótica, vários métodos podem ser empregados como: a determinação do número de linfócitos T ou B, a medida de citocinas produzidas ou dos níveis de anticorpos no soro, além do estudo das funções celulares. O número de células produtoras de IgA pode ser

determinado por meio da imuno-histoquímica em cortes histológicos, já a concentração de IgA no soro ou no fluido intestinal pode ser avaliada pelo método de ELISA (ENGVALL & PERIMANN, 1971).

O emprego da metodologia imuno-histoquímica possibilitou a avaliação da resposta imunológica nos linfonodos mesentéricos, cólon e íleo de suínos infectados por *Campylobacter sp.* (McORIST et al, 1992). Estes autores concluíram que havia proliferação de enterócitos imaturos, com acúmulo de IgA no citoplasma apical, em associação com o microrganismo, podendo representar produção do anticorpo específico.

A replicação dos enterócitos ocorre nas criptas, as quais apresentam grande capacidade mitótica. À medida que as células das criptas intestinais se multiplicam, migram para a base da vilosidade, empurrando as outras células epiteliais para a ponta, ocorrendo contínua migração de células para a extremidade da vilosidade. Conforme as células migram, elas amadurecem, modificando-se de células relativamente indiferenciadas na cripta para células absorptivas ou células caliciformes. À medida que as células atingem o topo das vilosidades, elas se soltam do epitélio por causa da idade e da exposição ao conteúdo intestinal. A velocidade com que essas células são eliminadas no topo das vilosidades, comparada com a velocidade com que elas são

substituídas pelas células das criptas, representa o fator determinante do tamanho da vilosidade (CUNNINGHAM, 1992).

O aumento no tamanho das vilosidades confere ao intestino maior capacidade digestiva e absorviva para atender à necessidade criada pelo aumento da ingestão alimentar, sendo esta proliferação celular, possivelmente regulada por ação hormonal, fatores de transformação do crescimento α e β (TGF- α e TGF- β), fator de crescimento "insulin-like", fator de crescimento epidermal (EGF) e peptídeo espasmolítico pancreático (RIBEIRO, 1996).

2.6 EMPREGO DOS PROBIÓTICOS NA DIETA DE SUÍNOS - MANEJO

A suplementação da dieta de suínos com probióticos é uma prática cada dia mais utilizada. Os estudos recentes que tratam da administração de culturas de *Lactobacillus* na ração avaliaram a qualidade do produto, bem como sua capacidade de sobrevivência no ambiente intestinal (ABE et al., 1995; MORENO et al., 1996).

Nas condições atuais de criação de suínos no Brasil, mesmo com o avanço do melhoramento genético, da nutrição e manejo, os sistemas de desinfecção das instalações das granjas não garantem que o ambiente esteja

totalmente livre de microrganismos patogênicos, o que impede a boa utilização dos nutrientes pelo animal. Por isso, o uso de antibióticos promotores de crescimento nos alimentos completos (rações) é prática constante, sendo substituídos de forma racional pelos probióticos (VASSALO et al., 1997).

VASSALO et al. (1997), através de experimento com suínos de 10 a 30 kg de peso corporal, alimentados com ração contendo dois tipos de probióticos, um composto de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* e o outro apenas elaborado com *Bacillus toyoi*, nas quantidades de 70 g/100 kg e 200 g/100 kg, observaram que a média de ganho de peso diário foi equivalente nos dois tratamentos, porém a incidência de diarreia se mostrou significativamente menor que nos grupos controle. Outro trabalho relatou a adição de *Lactobacillus casei* CCM4160 à dieta de leitoas prenhes, durante 12 dias seguidos sendo que aos 14 dias depois do parto, os leitões nascidos de mães não suplementadas e das que receberam o produto tiveram pesos médios de 3,76 Kg e 3,98 Kg, respectivamente, com taxas de mortalidade de 12,68% e de 9,36% (DANEK et al., 1991), indicando uma redução desta taxa, na ordem de 3,32%.

Alimentos fermentados, nas formas líquida ou pastosa, são usados para complementar a dieta de suínos, sendo os mais comuns o soro de queijo, amido e trigo e casca de batata. São caracterizados por terem baixo pH (3,5 - 4,5), altos níveis de ácido lático, um pouco de ácido acético e álcool. Possuem assim um número elevado de bactérias lácticas e leveduras. Por isso têm as propriedades de reduzir os coliformes no trato intestinal, aumentar as secreções pancreáticas e a altura das vilosidades, como também melhorar a digestibilidade e a absorção dos nutrientes. De acordo com dados, a altura das vilosidades intestinais tende a aumentar após dietas ricas em ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico presente naqueles alimentos. Além disso, por conterem altos níveis de ácidos orgânicos, podem ser usados como alternativa ao uso de promotores de crescimento antimicrobianos na ração (SCHOLTEN et al., 1999).

AUMAITRE et al. (1995) verificaram que os leitões geralmente apresentam dificuldades em se alimentar nas primeiras 24 horas após serem retirados de suas mães. Os animais, subitamente desprovidos de leite ficam em situação de balanço negativo de energia e quando recebem alimentação à vontade podem desenvolver comportamento alimentar irregular, resultando em ingestão precipitada que provoca distúrbios no trânsito intestinal.

A administração de probióticos contendo *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* na dieta de leitões recém-nascidos aumenta o ganho de peso em relação a controles que não receberam probióticos, principalmente nos primeiros aos 10 dias de vida onde a absorção intestinal é elevada. Além disso, ocorre diminuição na frequência das diarreias em consequência do equilíbrio da flora intestinal (ABE et al, 1995).

Alguns experimentos sugerem que não basta a administração de probióticos na dieta se esta não for devidamente balanceada, como indicou o trabalho de YUSTE et al. (1992), onde foi avaliado *Lactobacillus acidophilus* com relação ao desempenho de suínos desmamados precocemente. Neste experimento aos 21 dias de idade os animais foram alimentados com ração pré-inicial contendo 1,35% de lisina, 10% de leite em pó desnatado e 20% de soro de leite em pó, complementada com *L. acidophilus* nas quantidades de 10^9 a 10^{10} ufc/g/animal/dia. Os resultados obtidos em ganho de peso foram pequenos, o que mostrou que a ração escolhida pode ter sido inadequada.

Com relação ao desenvolvimento corporal, o uso do probiótico composto por *L. acidophilus*, *S. faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentou interações favoráveis ao ganho de peso, independente do sexo, porém, não se recomenda o produto para animais excessivamente magros,

reforçando-se mais uma vez a importância na adequação da dieta balanceada para melhorar a eficácia dos probióticos (MORENO et al, 1996).

KIM et al. (1998), verificaram que enzimas celulolíticas de *L. acidophilus* adicionados à dieta de suínos à base de sorgo, podem aumentar o ganho de peso dos animais, quando comparados aos grupos controle, porém não interferem diretamente na utilização dos nutrientes ou no crescimento total dos animais.

Os níveis séricos de colesterol em suínos podem ser diminuídos através da administração de *L. acidophilus* e variadas concentrações de cálcio. Isto porque em condições anaeróbicas os lactobacilos desconjugam os ácidos taurocólico e glicocólico. O aumento da desconjugação de ácidos biliares resulta em excreção dos mesmos, porque ácidos biliares são menos absorvíveis nos intestinos. Assim, esse mecanismo estimula a síntese de ácidos biliares a partir do colesterol, reduzindo o colesterol endógeno (RODAS et al., 1996).

As cepas de *L. acidophilus* de origem suína foram também avaliadas quanto à capacidade de redução do colesterol, concluindo-se que *L. acidophilus* suplementado na ração de animais desenvolve-se bem na presença

da bile e promove diminuição nos níveis de colesterol sérico (GILLILAND et al., 1985).

2.7 ADESÃO – COLONIZAÇÃO DO TUBO DIGESTIVO (ESÔFAGO ESTÔMAGO E INTESTINOS) POR *Lactobacillus* e *E. coli*

De acordo com JONSSON et al (1985), cepas de lactobacilos isoladas de uma determinada espécie animal, introduzidas na mesma espécie, devem sobreviver à passagem através do estômago, resistindo ao baixo pH. Dessa forma, a sobrevivência das cepas no estômago poderá assegurar a posterior fixação na mucosa intestinal, desde que resistam aos sais biliares e ao peristalismo.

Em geral, o estômago dos suínos secreta pouca quantidade de ácido clorídrico durante a primeira semana de vida, sendo que a acidez gástrica parece ser elevada devido à produção de ácido láctico pelas bactérias colonizadoras do trato digestivo. Sendo assim, a administração de lactobacilos propicia a formação de uma barreira ácida contra a invasão de organismos patogênicos. Em suínos recém-nascidos, nas primeiras 4 horas de vida foi observado um número de lactobacilos na ordem de 10^4 bactérias/g e de coliformes na ordem de 10^5 bactérias/g de fezes. Quando os animais são

suplementados com produtos à base de lactobacilos, o número de coliformes diminui muito, mesmo durante 30 dias após o término do tratamento (MURALIDHARA et al., 1977; FULLER et al., 1978).

TANNOCK et al. (1982), alimentaram suínos com leite autoclavado, contendo 2 ml de lactobacilos cultivados, durante 2 dias. Após 7 dias os animais foram sacrificados com clorofórmio e a porção esofágica do estômago retirada. Os resultados mostraram a colonização de grande parte do epitélio, sendo que as cepas que não aderiram permaneceram na luz.

Outro experimento mostrou que o *Lactobacillus acidophilus* colonizou o estômago e intestinos de suínos após 6 dias de inoculação, na quantidade de $10,5 \times 10^8$ ufc/g de tecido, principalmente o íleo e ceco (SARRA et al., 1991).

De acordo com PIVA & MORELLI (1997), suínos adultos quando suplementados com *L. acidophilus* ou *L. reuteri*, apresentam redução na capacidade de colonização por leveduras, coliformes e clostrídios no estômago, jejuno, íleo, ceco e cólon, além de redução do pH e dos níveis de amônia no jejuno e ceco. Os autores também demonstraram que *Lactobacillus fermentum*, *L. salivarius* e *Streptococcus salivarius* são isolados em maior quantidade de suínos lactentes, enquanto que o *L. acidophilus* predomina em suínos desmamados precocemente. Antes dos 21 dias de vida, lactobacilos e estreptococos estão intimamente associados à porção esofágica do estômago

de suínos, sugerindo que esta população de bactérias aderidas é responsável pela predominância de bactérias lácticas em suínos jovens.

Objetivando maior detalhamento da capacidade da adesão de *L. fermentum* e *S. salivarius* em estômago, íleo e ceco de suínos, BARROW et al. (1980) empregaram microscopia eletrônica de transmissão associada a duas técnicas de impregnação: vermelho de rutênio e ácido periódico-thiosemicarbazida-proteinato de prata (2- PA-TSC-Ag). Estes autores observaram através das duas técnicas a camada extracelular, composta por fibrilas, das bactérias aderidas à mucosa intestinal, e com a última técnica evidenciaram também a parede celular dos lactobacilos. Concluíram que para ocorrer a adesão, a camada extracelular deve permanecer intacta durante a passagem da bactéria pelo trato gastrointestinal.

Estudos recentes sobre a colonização intestinal de suínos por cepas específicas de lactobacilos demonstram aumento da capacidade de adesão à mucosa nas primeiras semanas de vida. A maior fonte de lactobacilos para o suíno recém-nascido é o contato direto com a mãe ao nascimento, onde entra em comunicação imediata com o canal vaginal e com as excreções do ambiente. Dessa forma, ocorre a formação da microflora intestinal do animal jovem sob condições naturais de colonização (TANNOCK et al, 1990).

ROJAS & CONWAY (1996) analisaram a adesão de lactobacilos em células epiteliais do trato intestinal de suínos e bezerros *in vitro* e observaram que 59% dos lactobacilos isolados apresentavam adesão epitelial. Estes autores verificaram ainda que algumas cepas aderem tanto às células epiteliais do intestino delgado humano como às de suínos, de acordo com suas características hidrofóbicas.

Lactobacillus sp pode ser isolado do conteúdo de todo o TGI de suínos. De fato, a porção não secretora do estômago (esofágica) possui um grande sítio mucoso para adesão dos lactobacilos, estando aderidos também à porção não secretora de muco. Isto provavelmente porque o muco gástrico dos suínos contém cerca de 28% de lipídeos, os quais são conhecidos como receptores ativos para lactobacilos (HENRIKSSON & CONWAY, 1996).

As bactérias lácticas, presentes naturalmente nos intestinos de suínos e outras espécies animais, como o *L. acidophilus* e outros lactobacilos, estreptococos e bifidobactérias, impedem a instalação de bactérias patogênicas. Esse mecanismo está diretamente relacionado à competição por nutrientes e colonização dos sítios de adesão, produzindo ácidos orgânicos e outras substâncias que tornam o ambiente desfavorável aos microrganismos indesejáveis. A atividade das bactérias lácticas pode ser estimulada pela alimentação dos animais com produtos à base de leveduras que contém

enzimas e nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento (CERCHIARI & BURATTO, 1989; PEDERSEN & TANNOCK, 1989).

Em estudos realizados com suínos durante três meses concluiu-se que o total de bactérias lácticas nas fezes era de 10^8 a 10^{10} ufc/g de fezes, estando a espécie *L. acidophilus* presente de forma constante e fazendo parte de 10% da população total dos microrganismos constituintes da flora intestinal (VON AULOCK & HOLZAPFEL, 1987).

2.8 ASPECTOS QUE DIZEM RESPEITO À VIABILIDADE E AOS PROBIÓTICOS INATIVADOS

OUWEHAND et al. (2000) afirmaram que os probióticos, para surtirem efeitos, devem veicular microrganismos viáveis, porque a inativação pode interferir nos processos de imunoestimulação e de adesão das cepas à mucosa. Quando o probiótico é inativado por calor ou irradiação gama, ocorre redução no número de cepas aderidas. Porém, o *Propionibacterium freudenreichii*, quando é inativado pelo calor pode ter sua capacidade de adesão aumentada, o mesmo acontecendo com o *Lactobacillus casei* Shirota, quando inativado por irradiação gama. O método considerado mais eficaz para o preparo de probióticos inativados é o da irradiação por raios ultravioleta

(UV). Segundo COCONIER et al. (1993), o uso de probióticos contendo células termicamente inativadas pode ter o efeito de inibir a adesão de microrganismos patogênicos na mucosa intestinal, reduzindo as diarreias. Porém, a produção de células IgA-positivas é maior quando as cepas que constituem o probiótico são viáveis. De acordo com OUWEHAND et al. (1999), a viabilidade das células veiculadas pelos probióticos é indispensável para a obtenção de bons resultados imunoestimuladores, ou seja, para agir no organismo como antígenos estimuladores das placas de Peyer e das células M.

2.9 O ESTRESSE APÓS O DESMAME

O desmame em leitões com 3 semanas de idade, acompanhado de estresse, resulta em um período irregular na ingestão de ração, com diarreia e com desempenho inferior. A redução na altura das vilosidades e o aumento na profundidade das criptas provocam o aumento da secreção de água e diminuição da absorção dos nutrientes, resultando em perdas de eletrólitos para a luz intestinal (SARRA et al., 1991).

A diarreia pós-desmame causa sérios prejuízos econômicos à suinocultura, através da diminuição do ganho de peso diário, retardo no crescimento e aumento na idade ao abate.

A colibacilose é causada pela invasão da porção anterior do intestino delgado por cepas patogênicas de *E. coli*. Uma vez colonizado o intestino, essas bactérias produzem enterotoxinas, que inibem o processo de absorção e aumentam a quantidade de líquidos na luz intestinal. Conseqüentemente, as vilosidades diminuem e apresentam uma menor área para absorção de nutrientes.

De acordo com RIBEIRO (1996), alterações na estrutura do intestino delgado após o desmame de leitões têm sido relatadas como fator predisponente de baixos desempenhos. O sistema imune do trato digestivo constitui-se em componente importante dos mecanismos controladores dos problemas entéricos, uma vez que evita o ataque e a penetração do epitélio intestinal por microrganismos e componentes antigênicos de origem alimentar. Durante o período de hipersensibilidade (imediatamente após o desmame) ocorrem alterações morfológicas na mucosa intestinal, como a atrofia das vilosidades e a hiperplasia de criptas, indicando maior perda de enterócitos nas vilosidades e aumento de sua taxa de produção nas criptas, comprometendo assim os eventos normais de digestão e absorção. A integridade anatômica do

trato gastrintestinal (macro e microscopicamente) é fundamental para que os processos digestivos possam ocorrer normalmente, sendo o período pós-desmame de leitões caracterizado por perda de peso e ocorrência de diarreia, decorrentes de ações bacteriana e/ou nutricional.

Para NABUURS et al. (1993), a altura das vilosidades intestinais diminui e a profundidade das criptas aumenta em função das diarreias. A suplementação das dietas durante o período de aleitamento é benéfica e evita a instalação de diarreias e das alterações morfológicas citadas. Segundo NABUURS et al. (1996), em leitões desmamados com 3 a 5 semanas de idade a absorção de nutrientes está prejudicada. Também nesta idade o animal é mais suscetível à multiplicação de bactérias enteropatogênicas como *Escherichia coli* e à instalação das rotaviroses. Os fatores que contribuem para que surjam as diarreias pós-desmame, como a falta de suplementação durante o aleitamento e a atrofia das vilosidades intestinais, potencializam a ação da *E. coli* seja intensa. Comparando-se animais durante o período de aleitamento materno, com desmamados e suplementados com bactérias lácticas após 4 dias do desmame, a média de altura das vilosidades no grupo suplementado foi maior, mas a profundidade das criptas foi semelhante em todos.

Quanto maior o tempo de aleitamento sem suplementação, maior é a frequência de animais com vilosidades intestinais baixas. Após o desmame, a

dieta fornecida aos leitões deve ser de alta digestibilidade para que a absorção seja adequada, como alimentos à base de óleo de milho e soro em pó (MAHAN & CERA, 1993). Como a atrofia das vilosidades intestinais reduz a absorção dos nutrientes, pode-se evitar esse processo com a adição de 1% de glutamina à ração, o que aumenta os níveis de aspartato, glutamato e alanina no plasma, o que auxilia no aumento dos níveis de proteína no soro (WU et al., 1996).

Leitões de cinco semanas de idade foram suplementados antes e após o desmame, com os seguintes compostos 1- olaquinox (antimicrobiano, promotor de crescimento); 2- bactérias lácticas, lactulose e lactitol (açúcares não absorvíveis); 3- bactérias lácticas não adesivas e 4- bactérias lácticas adesivas (probióticos). Este estudo foi feito objetivando avaliar os efeitos produzidos pelo olaquinox nas vilosidades intestinais, fazendo uma comparação com os probióticos. No primeiro grupo, do promotor de crescimento, houve aumento na profundidade das criptas. Os promotores de crescimento em geral, diminuem a espessura do epitélio intestinal, melhorando assim a absorção dos nutrientes. Neste trabalho, não foram observados esses resultados, ou seja, o olaquinox não produziu alterações nas vilosidades, mas os probióticos elevaram sua altura (NOUSIAINEN, 1991).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Douradinho, no Município de Uberlândia/MG. A granja mantém matrizes, machos das raças Agpic 419 fêmeas da raça 22. Foram selecionados 30 suínos recém-nascidos, mestiços das duas raças, incluindo machos e fêmeas, oriundos de três ninhadas distintas. O manejo na granja inclui o desmame aos 21 dias de idade, sendo que após sete dias de vida os animais são alimentados também com ração pré-inicial, contendo promotores de crescimento. Após o desmame o animais foram mantidos na creche até o momento do abate.

3.2 Probióticos

Dois produtos comerciais, utilizados na suplementação de suínos, foram administrados durante o experimento em animais recém-nascidos. O **Biobac** (CHR HANSEN), de origem dos USA, é utilizado na dieta de suínos, composto por células vivas de *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium bifidum* na concentração de $3,33 \times 10^6$ ufc/g de produto em

pó de cada microrganismo. Segundo recomendação do fabricante, o **Biobac** pode ser administrado na ração pré-inicial para suínos na quantidade de 1kg/tonelada de ração ou 3,0g/animal/dia para recém-nascidos. O outro produto é o **Grofactor** (VIRBAC), de origem da Dinamarca, composto pela cepa LB de *Lactobacillus acidophilus* inativada (corpos microbianos mortos em seu meio de cultura e inativados), em número de $2,5 \times 10^{11}$ ufc/kg de produto. Este produto pode ser usado tanto para suínos como para aves, sendo a quantidade indicada para suínos de 2 kg/tonelada de ração. O experimento foi feito do primeiro dia de vida até 30 dias de idade.

3.3 Tratamentos

Três ninhadas de leitões recém-nascidos foram separadas em grupos para receberem aditivos probióticos a partir do primeiro dia de vida. Todos os animais selecionados para o experimento foram alimentados exclusivamente com leite materno até completarem 7 dias de vida. A partir do oitavo dia, os animais, receberam o leite materno e ração pré-inicial. Até a segunda semana de vida o animal pode ingerir um total de 100g de ração e, ao completar a terceira semana, um total acumulado de 300g/animal, além do leite materno,

sendo a quantidade de ração fornecida em três parcelas ao dia com água à vontade. Aos 30 dias cada animal consegue ingerir cerca de 2,7 Kg de ração, sendo que, após o desmame, o consumo aumenta consideravelmente.

O grupo C (controle), formado por 7 animais, recebeu apenas água filtrada em substituição aos probióticos a serem testados, durante todo o período de tratamento. O grupo P2 (células vivas), com 8 animais, foi tratado com o produto Biobac, na dose de 3,0 g/animal/dia, diretamente na cavidade oral com seringa descartável. Foram administradas duas doses semanais, a partir do primeiro dia de vida, até os animais completarem 30 dias de idade. O grupo P₁ (células inativadas), com 10 animais, recebeu o produto Grofactor, diluído na mesma forma, 3,0 g/animal/dia (1,0 g/ml), com seringa descartável, em duas doses semanais, até os 30 dias de idade. Todos os grupos receberam aliquotas de 3,0 ml das misturas. Durante o período de 30 dias de experimento, os animais tiveram contato apenas com suas mães, além dos tratadores para prevenir contaminação cruzada.

Aos 30 dias de idade foi feita a coleta de sangue de todos os animais dos grupos, e a seguir três exemplares de cada grupo foram abatidos para coleta dos fragmentos de intestino delgado e linfonodos mesentéricos. A composição percentual e bromatológica, com as exigências nutricionais para

leitões é mostrada na Tabela 1. Essa foi a ração pré-inicial usada no experimento.

Tabela 1. Composição percentual e bromatológica da ração pré-inicial utilizada para leitões dos 8 aos 30 dias de idade.

Ingredientes (Kg)	(%)		
Milho	37,0		
Farelo de soja	20,0		
Açúcar	3,0		
Núcleo suíno pré-inicial 400 ¹	40,0		
Total	100,0		
Composição Bromatológica		Exigências nutricionais ²	
Energia digestível (Kcal/Kg)	3387	3390	
Proteína bruta (%)	18,98	20,0	
Cálcio (%)	0,72	0,80	
Fósforo disponível (%)	0,62	0,65	

¹ Composição percentual: Unidade 12%; Proteína bruta 17%; Extrato estéreo 3%; Cinzas 10%; Fosfato total 1%; Cálcio 1,65%; Fibra 2%; Ácido fólico 1,52 mg.; Ácido pantotêmico 45 mg.; Ácidos primário e fórmico 37,5 g.; Etoxiqum 0,37 g.; Baunilha 2,5 g.; Sacarina + Neoispiridina 2,5 g.; Olaquinox 0,25g.; Colina 900 mg.; Cobre 25 mg.; Cobalto 0,26 mg.; Ferro 125 mg.; Iodo 1,05 mg.; Lisina 10 g.; Manganês 37,5 mg.; Metionina 1,28 g.; Selênio 1 mg.; Sódio 0,31 g.; Treonina 3g.; Vitamina A 25.000 UI.; Vitamina B2 15 mg.; Vitamina B6 5,5 mg.; Vitamina D3 5.500 UI.; Vitamina E 125 mg.; Vitamina K 13,75 mg.; Zinco 7200 mg.; Niacina 90 mg.; Biotina 0,5 mg.

² Fonte: (VALVERDE, 1997)

3.4 Análise da resposta imune

3.4.1 Contagem de coliformes nas fezes

Para avaliar a eficácia dos tratamentos quanto à redução do número de coliformes nas fezes dos suínos, dois dias após o desmame, ou seja, no 23^o dia, três animais de cada grupo foram separados, mantidos em outro local e, em seguida contaminados com 0,5 ml de suspensão de *E. coli*, por via oral. Essa cepa foi cultivada em caldo infuso cérebro-coração (BHI) a 37^oC, durante 15 horas e ressuspensa em igual volume de solução salina contendo $1,0 \times 10^{10}$ ufc/ml de *E. coli*.

Para a determinação do número de coliformes fecais, as amostras de fezes foram coletadas diretamente com “swabs” estéreis, de forma a prevenir a contaminação da região perianal, mantidas imersas em 9 ml de solução salina refrigerada até o momento da análise laboratorial. A amostragem foi feita em todos os animais do grupo controle e nos grupos de tratamento 2 dias após a contaminação com *E. coli* (MURALIDHARA et al., 1977).

O método utilizado para identificação dos coliformes totais e coliformes fecais (*E. coli*) foi o SIM PLATE (IDEXX). Inicialmente, o meio de cultura

foi diluído em 100 ml de água destilada, e as amostras de fezes que eram mantidas em solução salina foram diluídas (10^{-2} a 10^{-5}). A seguir fez-se a transferência de 1 ml de amostra e 9 ml do meio de cultura para as placas, compostas por poços. Após homogeneização, o excedente foi descartado e as placas foram invertidas e incubadas a 35° C por 24 horas.

Para a contagem dos coliformes totais o princípio é o ONPG (ortonitrofenil beta – d galactopiranosídeo), os quais produzem a enzima beta – d galactosidase, que transforma o ONPG em ortonitrofenol, de cor violeta ou vermelha.

O princípio da reação produzido pelos coliformes fecais (*E. coli*) é o MUG (4 – metil umbeliferil glucoronídeo), onde produzem a enzima beta – d glucoronidase que reagem com o MUG, resultando no composto 4 – metil umbeliferona, de cor azul quando observado com lâmpada ultravioleta (Modelo B 160). As colônias desenvolvidas foram contadas, e o número foi convertido pela tabela de conversão (Tabela 2) e multiplicado pelo inverso da diluição de cada placa. O resultado foi expresso em número de coliformes totais e de coliformes fecais por grama de fezes.

Tabela 2. – Tabela de Conversão SimPlate NCR

Poços=população	Poços=população	Poços=população
1 = 2	31 = 76	61 = 216
2 = 4	32 = 80	62 = 224
3 = 6	33 = 84	63 = 232
4 = 8	34 = 86	64 = 240
5 = 10	35 = 90	65 = 248
6 = 12	36 = 94	66 = 256
7 = 14	37 = 96	67 = 266
8 = 16	38 = 100	68 = 276
9 = 18	39 = 104	69 = 288
10 = 22	40 = 108	70 = 298
11 = 24	41 = 112	71 = 312
12 = 26	42 = 116	72 = 324
13 = 28	43 = 120	73 = 338
14 = 30	44 = 124	74 = 354
15 = 32	45 = 128	75 = 372
16 = 36	46 = 132	76 = 392
17 = 38	47 = 136	77 = 414
18 = 40	48 = 142	78 = 440
19 = 42	49 = 146	79 = 470
20 = 46	50 = 150	80 = 508
21 = 48	51 = 156	81 = 556
22 = 50	52 = 160	82 = 624
23 = 54	53 = 166	83 = 738
24 = 56	54 = 172	84 = >738
25 = 58	55 = 178	
26 = 62	56 = 184	
27 = 64	57 = 190	
28 = 68	58 = 196	
29 = 70	59 = 202	
30 = 74	60 = 208	

Se todos os poços são negativos, a conversão = < 2

3.4.2 Imuno-histoquímica e identificação de células IgA-positivas

3.4.2.1 Processamento histológico

A identificação de células IgA-positivas nos linfonodos mesentéricos e duodeno foi realizada através de técnica imuno-histoquímica.

Após a retirada e amostragem dos órgãos, os fragmentos de tecidos foram fixados em formol 10% tamponado (tampão fosfato, pH 7,3) durante 24 horas à temperatura ambiente. A seguir o material foi rotineiramente incluído em parafina e foram obtidos cortes de 5 μm de espessura colhidos em lâminas de vidro.

3.4.2.2 Método histoquímico

O processamento histoquímico foi realizado na etapas que se seguem. Após a desparafinização com xilol por 20 minutos a 40-50⁰C e xilol por 15 minutos à temperatura ambiente, foi feita a hidratação em concentrações de álcool decrescentes (100-90-80-70%) durante 3 minutos cada. O bloqueio da fosfatase alcalina endógena foi feito com solução de ácido acético a 8% sendo

os linfonodos tratados por 10 minutos e os cortes de duodeno por 30 minutos (3 imersões de 10 minutos), seguido de lavagens em água corrente e em solução tampão TRIS 0,05M, pH 7,4, com 0,87% de cloreto de sódio (TBS), durante 5 minutos. Para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, o material foi incubado com soro normal de coelho diluído a 2,5% em TBS, durante 1 hora a 37°C. A etapa seguinte foi a incubação com anticorpo primário anti IgA suína produzida em cabra (SEROTEC), na diluição de 1/100 em TBS, durante uma noite a 4°C, seguido de 2 lavagens de 5 minutos cada com TBS. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo secundário anti cabra biotilado (IgG de coelho), diluído 1/100 em TBS durante 1 hora a 37°C com 2 lavagens seguidas de 5 minutos cada com TBS. Na amplificação da reação foi utilizado o complexo avidina biotina fosfatase alcalina (AB/PA), diluído 1/100 em TBS, incubando o material por 30 minutos a 37°C e mais 2 lavagens de 5 minutos cada com TBS. A revelação foi feita com fast red-naftol (SIGMA, St. Louis, Mi, USA) em TBS por 3 minutos, seguido de lavagens em água corrente e TBS. A coloração de fundo foi feita com hematoxilina de Meyer por 10 minutos, seguindo-se a diferenciação do corante em água amoniacal, corrente e destilada. Após secagem das lâminas ao ar, as lâminas foram montadas com glicerina, lamínula e esmalte, e o material analisado e fotografado em microscópio

óptico (Olympus) no aumento de 200 vezes. Como controle da reação, parte do material foi incubado com soro normal de coelho como anticorpo primário.

As concentrações ótimas de cada reagente, bem como os tempos de incubação foram determinados previamente mediante titulação em bloco dos mesmos, frente aos controles positivos e negativos de acordo com os procedimentos descritos por JEFFREY et al., (1991).

3.4.3 Dosagem de IgA por ELISA

Para dosagem de IgA total no soro foram retiradas amostras de sangue coletado da veia braquial dos animais tratados e do grupo controle. Após a coagulação, foi centrifugado e o soro permaneceu congelado para a pesquisa de IgA. A seguir, as placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (SIGMA- marca Costar) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti IgA suína produzida em camundongo (SEROTEC) , em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, diluído 1/100 em salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 a 0,05% (PBST) e incubadas durante uma noite a 4^oC . Após esse período, fez-se a lavagem das mesmas com PBST, em 3

ciclos de 5 minutos. Para o bloqueio foi utilizada a mistura de PBST com BSA a 1% (albumina suína bovina), 100 µl por poço, incubando-se por 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavagem. Foram adicionados 50 µl dos soros diluídos em PBST com BSA a 1% a 1/40 e 1/80 por poço, e incubados durante 2 horas a 37°C, com 3 lavagens seguidas. A etapa seguinte foi a adição do conjugado de anti IgA suína produzida em cabra (SEROTEC) com biotina, na diluição de 1/250 no mesmo diluente e incubada por 1 hora a 37°C, seguido por lavagem. Foi adicionado a seguir o complexo estreptavidina/peroxidase (SIGMA), na diluição 1/500 e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e a seguir lavagem. Adição do substrato enzimático 2,2 azino-bis (3-ethylbenzi-thiazoline-6-sulfonic acid) ou ABTS em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 e H₂O₂ foi adicionado, seguido da leitura em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 405 nm (DRÉAU, et al., 1994), e os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica (DO). A biotinilação da anti IgA suína foi realizada da seguinte maneira: 250 µg de Biotina 3-sulfo-N-hidroxisuccinamida / mg de anti IgA suína produzida em cabra. A mistura do anticorpo, biotina e DMSO foi incubada por 4 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após adição de NH₄Cl seguiu-se incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A mistura do anticorpo marcado foi dialisada contra

PBS, com seis trocas durante 48 horas, para remover a biotina e NH_4Cl não ligados.

Paralelamente, foram adicionados soros controles, positivos e negativos nas mesmas diluições. Como controle do conjugado, foram omitidas as amostras de soro, adicionando-se 50 μl por poço de PBST.

Os procedimentos utilizados nos cortes histológicos de intestino delgado e linfonodos mesentéricos foram realizados no Laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia do ICBIM da Universidade Federal de Uberlândia; a identificação por imuno-histoquímica de células produtoras e dosagem de IgA por ELISA foram feitos no Laboratório de Imunologia.

3.5 Morfologia das vilosidades intestinais

Fragmentos de 0,5 cm^2 do duodeno, jejuno e íleo foram seccionados no plano transversal, coletados e processados para estudo histológico. Após a enterectomia, as amostras foram colocadas em solução salina estéril para rápida lavagem e em seguida imersas em solução fixadora de Bouin. Após fixação por 24 horas à temperatura ambiente, as amostras passaram por

lavagem em água amoniacal por 1 hora e posteriormente em água por 12 horas. Finalizada a etapa de lavagem o material foi processado histologicamente para inclusão em parafina, mantendo-se a orientação transversal dos fragmentos. Cortes histológicos de 6 μm foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (BANCROFT & STEVENS, 1982).

O exame dos preparados histológicos foi realizado, com o fim de medir a altura e largura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais. Para tanto, utilizou-se o sistema de análise de imagens por microcomputador, definindo-se em cada corte histológico dez campos microscópicos com o emprego de objetiva de 40x. Através desse método, cujo plano de corte favorece a observação de toda a estrutura da vilosidade da base ao ápice, os campos escolhidos são projetados na tela do computador e as medidas anotadas. Para tanto, foi utilizado um microscópio trinocular, marca Olympus BH2, com câmara acoplada JVC-TK-1085 V e placa digitalizadora DATA TRANSLATION DT 3153. Para análise das imagens foi empregado o "Software HL Image ++ 97" (Western Vision Software). A análise morfológica e morfométrica das vilosidades e criptas intestinais foram realizadas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

3.6 Análise estatística

Para determinar a significância das diferenças observadas nos grupos experimentais em relação ao controle quanto à quantidade de IgA no soro, da análise da altura e largura das vilosidades e profundidade das criptas intestinais, após obtenção dos valores médios para cada grupo foi empregado o teste t de Student ($P < 0,05$) (COSTA NETO, 2000). A dosagem de IgA no soro foi feita em todos os animais do grupo Controle ($n=7$), nos suplementados com células vivas ($n=10$) e nos que receberam células inativadas ($n=8$). Na análise morfológica foram medidos 10 campos/corte/animal, escolhidos entre 2 cortes em cada lâmina dos fragmentos de intestino delgado.

3.7 Documentação fotográfica

A documentação fotográfica dos preparados histológicos para imunohistoquímica foi feita em fotomicroscópio (Olympus), em aumento de 200 vezes com filme Kodacolor (KODAK) ASA 400.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da resposta imune

4.1.1 Contagem de coliformes nas fezes

Os resultados de ganho de peso dos animais foram obtidos pela média dos pesos aos 30 dias, menos a média aos 21 dias de idade. Desde o dia do nascimento, os leitões do grupo C (controle) mostraram pesos maiores que os animais dos grupos em tratamento, porém o maior ganho de peso, após o desmame, foi o do grupo P2 (células vivas), demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Média de peso (Kg) e ganho de peso (Kg) de leitões ao nascimento, 21 e 30 dias de idade tratados com diferentes tipos de probióticos.

Grupo	Dias			Ganho de peso	Número de animais
	01	21	30		
C	1,7	6,6	8,5	1,9	7
P ₁	1,3	5,0	7,3	2,3	8
P ₂	1,5	5,1	7,8	2,7	10

O grupo C é controle, o grupo P1 recebeu bactérias inativadas, o grupo P2 recebeu células vivas. O ganho de peso foi calculado da seguinte forma: a média de peso aos 30 dias menos a média de peso aos 21 dias.

Os resultados da contagem de coliformes totais e fecais, dos três grupos, dois dias após o desmame, mostraram valores menores de coliformes fecais, por grama fezes, no grupo P₂ (células vivas). Esse grupo não apresentou diarreia durante todo o período de tratamento, ou seja, manteve o equilíbrio da flora intestinal.

Já o grupo P₁, o qual foi tratado com bactérias inativadas, teve diarreia na segunda e na terceira semanas, daí o maior número de coliformes fecais (Tabela 4). Os animais, desse grupo receberam duas doses diárias do produto para controlar o distúrbio intestinal, e o resultado foi positivo, permanecendo os mesmos em boas condições de saúde.

Tabela 4. Média do número de coliformes totais e fecais por grama de fezes de leitões aos 23 dias de idade tratados com diferentes tipos de probióticos.

Grupo	Coliformes totais (ufc/g)	Coliformes fecais (ufc/g)	Número de animais
C	$6,6 \times 10^6 \pm 6,90 \times 10^6$	$0,63 \times 10^6 \pm 0,67 \times 10^6$	7
P ₁	$2,8 \times 10^6 \pm 2,02 \times 10^6$	$2,35 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^6$	8
P ₂	$6,8 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$0,068 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$	10

C = animais controle, P₁ = animais tratados com células inativadas, P₂ = animais tratados com células vivas.

De acordo com os resultados, o grupo C (controle) apresentou quantidades menores de coliformes fecais do que o grupo P1 (células inativadas). Os animais daquele grupo eram, desde o dia do nascimento, maiores e mais desenvolvidos de todos os animais escolhidos para o experimento.

4.1.2 Imuno-histoquímica e identificação de células IgA - positivas

As células IgA – positivas foram identificadas no linfonodo mesentérico e no duodeno, por imuno-histoquímica, com o objetivo de avaliar se os tratamentos produziram maior número de células específicas que no grupo controle.

O grupo P₂, que recebeu células viáveis, apresentou maior quantidade de células IgA – positivas (Figura 5a), que os grupos P1 e C (Figuras 5b e 5c), respectivamente. As figuras mostram cortes de linfonodo mesentérico, com células reativas em vermelho, pela reação com ácido acético, fast red-naftol, e coradas com hematoxilina de Mayer.

No duodeno, as células IgA – positivas também foram identificadas da mesma forma, usando como anticorpo primário a anti-IgA suína produzida em cabra. Foi testado esse anticorpo, porém produzido em camundongo, mas a

reação foi inespecífica. Os resultados da imunorreação no duodeno demonstraram as células IgA – positivas do grupo P2 (Figuras 6 a1 e 6 a2), distribuídas igualmente pelo epitélio e lâmina própria. Aparentemente, a distribuição e a quantidade das células no duodeno dos animais dos grupos P1 e C (Figuras 6b e 6c) foi semelhante a do grupo que recebeu células viáveis.

O maior número de células IgA – positivas encontrado no linfonodo mesentérico do grupo P2, indica que o probiótico induziu uma boa estimulação nesse grupo, ou seja, a resposta à presença das bactérias viáveis no intestino foi adequada.

4.1.3 Dosagem de IgA por ELISA

A dosagem de IgA no soro dos animais controle e de tratamento teve como objetivo principal a avaliação da eficácia dos probióticos quanto à capacidade imunoestimuladora.

Inicialmente, foi feita a sensibilização das placas com o anticorpo monoclonal anti IgA suíno, produzido em camundongo (SEROTEC). Para o bloqueio da reação foram testadas soluções de PBS-Tween (PBST) 0,3%, sem resultado; PBST 0,05% com Molico 5% e PBST 0,05% com BSA 1%, o qual apresentou o melhor resultado de bloqueio. Das diluições escolhidas para o

soro, 1/40 e 1/80, a melhor leitura foi obtida em 1/40 após 15 minutos de reação em 405 nm.

O grupo P2 (células vivas), que recebeu as células viáveis, mostrou a maior quantidade de IgA no soro, em densidade óptica, com a média de $1230,50 \pm 119,60$, O grupo C (Controle) teve média $1047,57 \pm 115,53$, e o grupo suplementado com bactérias inativadas, P1 (Grofactor), $1043,87 \pm 120,46$ (Figura 4).

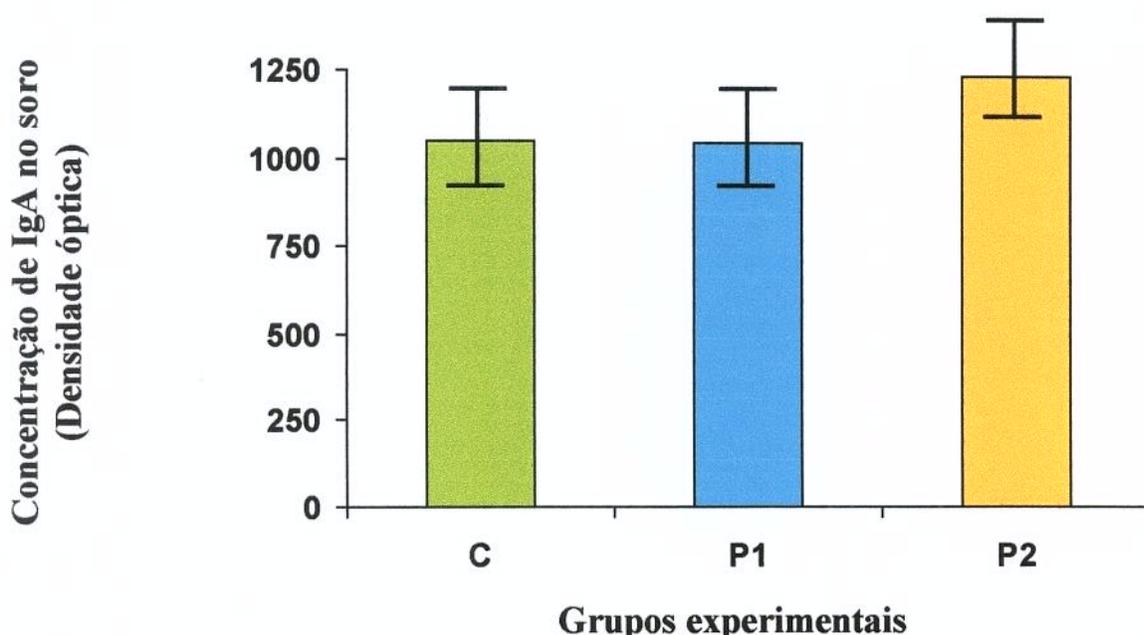


Figura 4 – Concentrações de IgA no soro de leitões suplementados com probióticos, medidas por ELISA. As colunas representam as médias obtidas das amostras do soro, lidas a 405 nm durante 15 minutos. No grupo C (controle) a densidade óptica foi de $1.047,57 \pm 115,53$ ($n=7$); no grupo P1 (Grofactor) de $1.043,87 \pm 120,46$ ($n = 8$) e no grupo grupo P2 (Biobac) de $1.230,50 \pm 119,60$ do ($n = 10$). Houve diferença significativa ($P<0,05$) entre o grupo P2 e os grupos C e P1.

4.2 Análise morfológica das vilosidades intestinais

No presente trabalho, foram feitas 10 medidas de altura e largura das vilosidades e as mesmas medidas de profundidade das criptas para 3 animais de cada grupo. Os valores médios das alturas foram tomados da parte superior da cripta até o ápice da vilosidade. A profundidade foi medida da base da cripta até sua parte superior. Os valores médios encontrados para duodeno, jejuno e íleo foram medidos em micrômetros (Tabela 5).

Tabela 5. Médias da altura (AV) e largura (L) das vilosidades e profundidade das criptas (PC) da mucosa intestinal do duodeno, jejuno e íleo de leitões, aos 9 dias pós-desmame, expressas em micrômetros. Grupos P1 (células inativas) e P2 (células ativas), suplementados com probióticos e grupo C (controle)

Órgão		GRUPO		
		C	P1	P2
Duodeno	AV	359,3 ± 48,5 <i>a</i>	387,2 ± 25,8 <i>a</i>	443,1 ± 92,8 <i>b</i>
	L	173,3 ± 47,9 <i>a</i>	156,6 ± 25,9 <i>a</i>	134,2 ± 34,5 <i>a</i>
	PC	548,1 ± 52,9 <i>a</i>	469,3 ± 46,2 <i>b</i>	460,6 ± 44,7 <i>b</i>
Jejuno	AV	319,6 ± 18,6 <i>a</i>	338,6 ± 37,1 <i>a</i>	441,4 ± 95,5 <i>b</i>
	L	119,8 ± 27,7 <i>a</i>	121,7 ± 6,7 <i>a</i>	116,6 ± 13,6 <i>a</i>
	PC	316,6 ± 66,5 <i>a</i>	343,3 ± 54,6 <i>a</i>	283,7 ± 19,0 <i>b</i>
Íleo	AV	272,8 ± 12,2 <i>a</i>	331,7 ± 2,2 <i>a</i>	395,5 ± 99,4 <i>b</i>
	L	103,4 ± 11,4 <i>a</i>	125,9 ± 9,0 <i>a</i>	125,5 ± 17,7 <i>a</i>
	PC	293,7 ± 64,4 <i>a</i>	247,6 ± 17,3 <i>a</i>	270,4 ± 21,3 <i>a</i>

A comparação estatística foi feita entre as médias que estão na mesma linha. Assim, as médias na mesma linha que tem letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A maior média obtida para altura das vilosidades (AV) foi de 443,1 micrômetros, no duodeno do grupo P2 (Biobac), seguido de 387,2 micrômetros do grupo P1 (Grofactor). As diferenças entre elas foram significativas ($P < 0,05$). O grupo C (controle) apresentou, no duodeno, a maior média na profundidade das criptas (PC), de 548,1 micrômetros e a menor altura das vilosidades (AV) no íleo, de 272,8 micrômetros, com diferenças significativas na comparação com o grupo P2 (Biobac).

O aspecto das vilosidades do duodeno é mostrado na Figura 7; do jejuno na Figura 8 e do íleo na Figura 9.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise da resposta imune

5.1.1 Contagem de coliformes nas fezes

O grupo P2 (células vivas) apresentou o maior ganho de peso, após o desmame, em comparação aos grupos P1 (células inativadas) e C (controle), sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 3. Os três grupos de animais receberam a mesma ração pré-inicial, a partir do oitavo dia de idade, além do leite materno e água à vontade. A melhoria no ganho de peso de suínos que recebem o alimento completo (ração) contendo probióticos pode ser atribuída, entre outros fatores, o equilíbrio entre a flora natural e a patogênica do trato digestivo e à maior absorção dos nutrientes pela mucosa intestinal (VASSALO et al., 1997). Ocorre, dessa forma, uma transformação de compostos pouco solúveis em compostos facilmente solúveis.

De acordo com a composição bromatológica do alimento completo (ração) fornecido aos leitões (Tabela 1), os níveis de energia digestível, proteína bruta, cálcio e fósforo disponível ficaram um pouco abaixo do estabelecido pelas exigências nutricionais.

A ração fornecida continha 40% do núcleo suíno pré-inicial, onde estava presente o promotor de crescimento, olaquinox 0,25 g. O olaquinox faz parte dos antimicrobianos usados como promotores de crescimento na dieta dos suínos e aves. É da classe das quinoxalinas e deve ser retirado da alimentação no mínimo dois dias antes do abate dos animais. A dose a ser administrada na ração é de 25 g a 100 g/ton do alimento de animais até 35 kg de peso vivo (BARCELOS & SOBESTIANSKY, 1998).

Estudos feitos com esse composto em leitões de cinco semanas de idade, mostraram que o olaquinox produziu aumento na profundidade das criptas, o que não ocorre em geral quando se acrescentam promotores de crescimento aos componentes do alimento completo (NOUSIAINEN, 1991).

Os resultados de nosso trabalho mostraram que o número de coliformes fecais por grama de fezes, encontrado no grupo P2 (células vivas) foi o menor dos três grupos (Tabela 4). Também nesse grupo, o ganho de peso no período pós-desmame, ou seja, dos 21 aos 30 dias de idade, foi maior que nos demais grupos (Tabela 2).

O produto administrado na dieta do grupo P2 (células vivas), veicula uma associação de bactérias produtoras de ácido lático e bacteriocinas, sendo todas elas viáveis, onde três gêneros distintos agem de forma simbiótica após entrar em contato com o trato intestinal dos animais. Em nosso experimento,

os leitões receberam, por via oral, estes microrganismos logo após o nascimento. Durante a primeira semana de vida, o estômago dos suínos secreta pouca quantidade de ácido clorídrico, responsável pela formação de uma barreira ácida contra a invasão de organismos patogênicos. Sendo assim, a administração de bactérias lácticas, nesta fase, substitui a falta de ácido clorídrico pela formação de ácido lático no estômago (FULLER, et al., 1978).

A redução no número de *E. coli* nas fezes do grupo P2 significa que ocorreu o equilíbrio entre a flora natural e a patogênica no lume intestinal. Isso contribuiu para que os animais respondessem bem ao tratamento, não apresentassem diarreia durante os 30 dias e que tivessem ganho de peso superior aos demais grupos, como o P1 (células inativas) e C (controle). O grupo P1 (células inativas) apresentou diarreia na segunda e terceira semanas, e o maior número de coliformes fecais por grama de fezes (Tabela 4).

Com relação à colonização do trato intestinal, a quantidade de bactérias em leitões na primeira semana de vida atinge cerca de 10^9 ufc/g de fezes no intestino delgado e de 10^{11} ufc/g no ceco e colón. Da primeira até a quarta semana de vida, a quantidade de *E. coli* encontrada no intestino de leitões tem uma redução natural de 10^9 ufc/g para 10^6 ufc/g de fezes, dependendo se o animal vive em condições adequadas de higiene, ou se foi alimentado com alimento completo (ração) adicionado de substâncias inibidoras do

crescimento bacteriano, como antibióticos promotores de crescimento ou probióticos (JENSSEN-WAERN et al., 1998; BUTLER et al., 2000).

Os resultados do nosso experimento demonstraram que a quantidade de coliformes fecais encontrada, para os três grupos, está entre os níveis considerados aceitáveis para leitões até a quarta semana de idade, de 10^6 ufc/g de fezes (Tabela 4).

No trato intestinal em equilíbrio predominam, logo após o nascimento, as enterobactérias e os estreptococcus. Isso depende do tipo de contaminante ambiental em que o animal é exposto, como fezes da própria mãe, água ou alimentos contaminados. Aos 21 dias de idade os lactobacilos podem estar presentes em quantidades mais elevadas que os organismos patogênicos, em torno de 10^8 ufc/g a 10^9 ufc/g de fezes, e às vezes se mantêm nesses níveis até 45 dias de idade (NAITO et al., 1995).

5.1.2 Imuno-histoquímica e identificação de células secretoras de IgA

De acordo com TIZARD (1998), as células IgA-positivas deixam o intestino e circulam pela corrente sanguínea, migrando para os locais efetores, como os linfonodos mesentéricos. Nos suínos, 90% das células que contêm imunoglobulinas na lâmina própria, produzem IgA.

As células IgA-positivas em linfonodo mesentérico e duodeno foram identificadas por imuno-histoquímica, com o objetivo de avaliar se, após os tratamentos com probióticos, as células estariam presentes em maior número que nos animais controles.

Os resultados mostraram que o grupo P2 (células vivas) apresentou a maior quantidade de células IgA – positivas no linfonodo mesentérico (Figura 5a). Isso indica que o produto que veiculou células viáveis atuou diretamente no processo de estímulo à produção de IgA específica.

Quando se acrescentam probióticos à dieta, espera-se que os mesmos funcionem como antígenos, os quais devem estimular a produção de IgA. Comparando-se um probiótico composto por células vivas, ou viáveis, com outro elaborado com células inativadas, a resposta imunológica mediada pelas placas de Peyer no intestino delgado, deve ser necessariamente maior no primeiro. Segundo COCONIER et al (1993), probióticos que contêm células inativadas possuem normalmente a capacidade de inibir a adesão de microrganismos patogênicos à mucosa intestinal, evitando assim as diarreias nos animais. Porém, o produto com células inativadas é menos eficaz em estimular a produção de IgA e de células IgA – positivas, provavelmente porque deixa de existir a interação direta da bactéria com a célula epitelial (OUWEHAND et al., 2000).

A maior quantidade de células IgA – positivas identificadas no linfonodo mesentérico do grupo P2 (células vivas) resultou do estímulo da produção de IgA na mucosa intestinal pelas bactérias viáveis. Já no grupo P1 (células inativadas), a quantidade de células IgA – positivas no linfonodo mesentérico (Figura 5 b), foi semelhante ao grupo controle (Figura 5 c). Dessa forma, pode-se dizer que as células inativadas mantiveram a produção de IgA, porém deixaram de induzir a resposta de produção de células IgA – positivas.

Os probióticos com células vivas agem como antígenos, que atravessam as células M e são apresentados aos linfócitos intraepiteliais destas células. Os plasmócitos da mucosa intestinal secretam então a IgA, que é absorvida pelos enterócitos. A produção de IgA específica faz com que haja uma resposta nos linfonodos mesentéricos, com aumento na produção de células IgA – positivas (TIZARD, 1998).

5.1.3 Dosagem de IgA por ELISA

Os resultados que obtivemos na dosagem de IgA no soro dos leitões, aos 30 dias de idade, mostraram que o tratamento feito com células vivas, no grupo P2, resultou em maior produção de IgA que nos demais grupos (Figura 4). De acordo com esses dados, podemos dizer que o produto que veiculou

células vivas intercedeu de forma específica na produção do anticorpo, e isso faz com que os animais fiquem mais resistentes às infecções intestinais (VERDES, 1996). Os resultados para a produção de IgA foram significativos ($P < 0,05$) entre o grupo P2 (células vivas), comparado aos grupos P1 (células inativadas) e C (controle).

No grupo P1 (células inativadas) a média da concentração de IgA no soro foi menor que a do grupo P2 (células vivas). A respeito do uso de probióticos com células inativadas, sabe-se que as bactérias contidas no produto crescem previamente em meios de cultura apropriados, produzindo metabólitos para, a seguir, serem inativadas termicamente. Esses produtos comerciais divulgam, entre outros benefícios, a propriedade de estimular a síntese de IgA específica no trato intestinal. A IgA produzida assim, atingiria, segundo os fabricantes, concentrações elevadas no soro.

Quando os probióticos veiculam células vivas, como no caso do grupo P2, os cultivos agem como antígenos benéficos ao hospedeiro e estimulam a síntese de IgA nos tecidos linfóides intestinais (OUWEHAND et al., 1999). Entretanto, a inativação de microrganismos probióticos pode manter a capacidade das cepas de inibir os agentes patogênicos no intestino delgado, mas não estimula a produção de IgA em maior quantidade que nos animais controles (COCONIER et al., 1993). Isso foi o que ocorreu no grupo P1

(células inativadas), onde a concentração de IgA no soro foi semelhante à encontrada no grupo C (controle).

5.2 – Análise morfológica das vilosidades intestinais

De acordo com os nossos resultados, no grupo P2 (células vivas) a altura das vilosidades (AV) foi maior e a profundidade das criptas (PC) foi menor em relação aos demais grupos (Tabela 5). Quando isso ocorre, a capacidade de absorção dos nutrientes no intestino delgado deverá necessariamente estar aumentada (RIBEIRO, 1996). Isso se deve aos efeitos que as bactérias vivas, componentes dos probióticos, produzem durante sua passagem e adesão à mucosa intestinal. Os principais efeitos são os de competir com as bactérias patogênicas, fazendo com que sejam inibidas na luz intestinal e deixem de provocar as diarreias e as perdas dos nutrientes. Com o uso dos probióticos, espera-se que os distúrbios intestinais diminuam e que isto resulte no desenvolvimento adequado da morfologia intestinal favorecendo o melhor desempenho dos animais.

Após o nascimento, o trato gastrintestinal dos suínos desenvolve-se rapidamente, e a área absorptiva do intestino delgado dobra na primeira

semana. A máxima capacidade de absorção e digestão, onde o animal apresenta uma grande área luminal, como altas vilosidades, e enterócitos maduros, é fundamental para o seu desenvolvimento. Sendo assim, fatores adversos que alteram a morfologia normal dos intestinos, como as diarreias e outros, provocam disfunção intestinal (CERA et al., 1988).

O desmame tem sido considerado como um dos momentos principais, onde ocorrem modificações importantes no aspecto da mucosa intestinal dos suínos. Essas mudanças incluem diminuição na altura das vilosidades (destruição de enterócitos), e aumento na profundidade da lâmina própria (aumento da profundidade das criptas, proliferação celular e perda de enterócitos maduros), seguido de redução na absorção dos nutrientes.

Após o desmame, as diarreias bacterianas ou virais podem causar danos ao epitélio intestinal, destruindo enterócitos e reduzindo a altura das vilosidades. A alteração da dieta contribui para este efeito, uma vez que as rações usadas para suínos são à base de soja, que podem ter resíduos de hexano com efeito antinutritivo. O hexano é utilizado no processo de extração do óleo de soja. Até 12 dias após o desmame, a diminuição na altura das vilosidades pode ser considerada uma alteração normal em suínos (DUNSFORD et al., 1989). Quando a profundidade da lâmina própria aumenta, há perda de enterócitos maduros nas vilosidades, conseqüentemente

ocorre a redução na atividade das enzimas lactase e α -glicosidase situadas na membrana plasmática dos enterócitos (MILLER et al., 1986).

Os efeitos produzidos pelos probióticos nos intestinos são, principalmente, os de manter o equilíbrio da flora natural, e evitar alterações morfológicas das vilosidades intestinais após o desmame, melhorando a absorção dos nutrientes e o ganho de peso dos animais (NABUURS et. al., 1993).

No nosso experimento, porém, a administração do probiótico com células inativadas, grupo P1, não resultou em efeitos morfológicos na mucosa intestinal, apesar de ser um produto comercializado com a finalidade de aumentar a capacidade de absorver nutrientes no intestino delgado.

As criptas do duodeno do grupo C (controle) são mais profundas (PC) que as dos demais grupos; a altura das vilosidades (AV) foi menor para este grupo. Estudos mostram que a falta de suplementos, como os probióticos, durante o período de aleitamento, pode provocar atrofia das vilosidades intestinais, além do aumento na profundidade das criptas com perdas na absorção dos nutrientes (MAHAN & CERA, 1993).

A ração pré-inicial usada para os leitões, no nosso experimento, continha 40% de núcleo suíno pré-inicial contendo olaquinox a 0,25 g/kg do produto. A quantidade desse promotor de crescimento na ração deve ser de 25

g a 100 g/ton de ração (BARCELOS & SOBESTIANSKY, 1998). Todos os grupos receberam o mesmo alimento completo (ração), antes e após o desmame, até completarem 30 dias de idade.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5), o grupo P2 (células vivas) confirmou que a viabilidade das cepas contidas no produto forneceu as condições para o alongamento das vilosidades (AV), sendo maiores que nos outros grupos. As células viáveis competem com os microrganismos patogênicos pelos sítios de adesão na mucosa intestinal, diminuindo a incidência de diarreias e melhorando a absorção dos nutrientes disponíveis. Esse mecanismo interfere diretamente no restabelecimento da mucosa intestinal, aumentando a altura das vilosidades (RIBEIRO, 1996).

O maior ganho de peso foi o grupo P2 (células vivas), após o desmame, e pode ser atribuído a esses fatores, principalmente à maior absorção dos nutrientes em consequência da melhoria da capacidade de absorção das vilosidades no duodeno.

No grupo P1 (células inativadas), porém, a altura das vilosidades (AV) nos três segmentos do intestino foi menor que no grupo P2 (células vivas). Se as células são inativadas, elas perdem a capacidade de interagir com o epitélio e deixam de induzir as alterações necessárias na estrutura da mucosa, como o aumento nas vilosidades. Foi o que ocorreu também no grupo C (controle),

que, mesmo tendo ingerido promotor de crescimento como os demais grupos, apresentou vilosidades mais baixas e criptas mais profundas (PC). Os aditivos promotores de crescimento têm a função de prevenir a atrofia das vilosidades (BUTOLO, 1998).

6 CONCLUSÃO

O produto formulado com cultivos mistos, de bactérias viáveis, foi o que se mostrou mais adequado para ser incluído na dieta dos leitões recém-nascidos. A resposta imunológica demonstrada pelo aumento da produção de IgA no soro e a presença de células IgA – positivas nos linfonodos mesentéricos, as quais migraram do trato intestinal até os órgãos linfóides, foram ambas induzidas pelas bactérias vivas.

O probiótico composto por células vivas contribuiu para que os animais tratados com eles tivessem vilosidades duodenais maiores.

Comparando-se os resultados do probiótico com células viáveis, com o composto por células inativadas, esse produto não se mostrou tão eficiente na promoção da imunoestimulação, uma vez que no soro a quantidade de IgA produzida pelos animais tratados com células inativadas foi semelhante à encontrada no grupo controle. Isso mostra que não houve estímulo na produção desse anticorpo com o uso de um produto inativado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F., ISHIBASHI, N., SHIMAMURA, S. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. **Journal of Dairy Sci.**, Champaign v.78, n.12, p.2838-2846, 1995.
- AULOCK, M. H. M. Von, HOLZAPFEL, W. H. Frequency and occurrence of *Lactobacillus acidophilus* in the gut of the pig, as indicated by its presence in the faeces. **Journal of veterinary Res.**, v.54, n.4, p.581-583, 1987.
- AUMAITRE, A., PEINIAU, J., MADEC, F. Digestive adaptation after weaning and nutritional consequences in the piglet. **Pig News and Information.**, New York, v. 16, n.3, p.73N-79N, 1995.
- BANCROFT, J. D. & STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**, 2nd ed. Churchill Livingstone, 1982. 662 p.
- BARCELOS, D & SOBESTIANSKY, J. **Uso de antimicrobianos em suinocultura**. Goiânia, 1998, 108 p.

BARROW, P.A., BROOKER, B.E., FULLER, R., NEWPORT, M.J. The attachment of the pig and its importance in the microecology of the intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.48, p. 147-154, 1980.

BIANCHI, A. T. J., ZWART, R. J., JEURISSEN, S. H. M., MOONEN-LEUSEN, H. W. M. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 201-221, 1992.

BRANDTZAEG, P., HALSTENSEN, T. S., KETT, K., KRAJCI, P., KVALE D., ROGNUM, T. O. , SCOTT, H., SOLLID, L. M. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 97, n. 6, p. 1562-1584, 1989.

BROCK, T. D. **Biology of microorganisms**. Library of Congress Cataloguing-in publication Data. 76th ed. New Jersey: 1994. 386 p.

- BROOKER, B.E. & FULLER, R. Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium. **Journal of Ultrastructure Research**, San Diego, v.52, n.1, p.21-31, 1975.
- BUTLER, J.E.; SUN, J.; WEBER, P.; NAVARRO, P.; FRANCIS, D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrintestinal tract seletively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. **Immunology**, Oxford, v. 100, p. 119-130, 2000.
- BUTOLO, E. A. F. Leveduras vivas e termolisadas na alimentação animal. Simpósio sobre ingredientes na alimentação animal. Campinas: p. 191-198, 2001.
- BUTOLO, J.E. Agentes antimicrobianos em rações de aves e suínos. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Botucatu, **Anais**: p. 37-254, 1998.
- CERA, K.R; MAHAN, D.C.; CROSS, R.F.; REINHART, G.A.; WHITMOYER, R.E. Effect of age, weaning and posweaning diet on small

intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal Animal Sci.**, Champaign, v. 66, p. 574-584, 1988.

CERCHIARI, E., BURATTO, L. Intestinal microflora and animal production **Obiettivi e Documenti Veterinari**, Bologna, v. 10, n.11, p. 19-24, 1989.

COCONIER, M.H; BERNET, M.F.; CHAUVIÈRE, G.; SERVIN, A.L. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. **Journal of Diarrhoeal Disease Research**, Dhaka, v. 11, p. 235-242, 1993.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. São Paulo: SINDIRAÇÕES/ANFAR; Campinas: CBNA/SDR/MA, 371 p., 1998.

COSTA NETO, P.L.O. **Estatística** 18^a reimpressão. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. 264 p.

CUNNINGHAN, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. 450 p.

- DANEK, P.; NOVAK, J.; SEMRADOVA, H.; DIBLIKOVA, E. Administration of the probiotic *Lactobacillus casei* CCM 4160 to sows: its effects on piglet efficiency. **Zivocisna Vyroba**, v. 36, n. 5, p. 411-415, 1991.
- DI NOLA, F., ARIONE, R., BRAMATO, C.; MARIETTI, C. IgA Secretorie: Recenti acquisizioni. **Minerva Medica**, Torino, v.82, n.6, p. 313-324, 1991.
- DUGAS, B.; MERCENIER, A.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; ARNAUD, C.; DUGAS, N.; POSTAIRE, E. Immunity and probiotics. **Immunology today**, Barxing, v. 20, n.9, p. 387-390, 1999.
- DUNSFORD, B.R.; KNABE, D.A.; HAENSLY, W.E. Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early-weaned pig. **Journal Animal Science**, Champaign, 67: 1855-1863, 1989.
- ENGVALL, E.; PERIMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labelled anti-Immnglobulin in antigen coated tubes. **Journal Immunology**, Baltimore, v.109, p.129, 1971.

EQUIPE TÉCNICA BIOTECNAL. **O fantástico mundo dos probióticos.**
Três Corações, 1998. 97 p.

FULLER, R., BARROW, P.A., BROOKER, B.E. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.35, n.3, p. 582-591, 1978.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

GILLILAND, S. E., NELSON, C. R. and MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* **Applied Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 49, p.377-382, 1985.

HENRIKSSON, A. & CONWAY, P.L. Adhesion of *Lactobacillus fermentum* 104-S to porcine stomach mucus. **Current Microbiology**, New York, v.33, p.31-34, 1996.

HOSE, H., SOZZI, T. Biotechnology Group Meeting - Probiotics -fact or fiction? **Journal Chemical Technology Biotechnology**, London, v.51, n.4, p.540-544, 1991.

JEFFREY, G.P., REED, W.D., CARRELLO, S., SHILKIN, K.B. Histological and immunohistochemical study of the gall bladder lesion in primary sclerosing cholangitis. **Gut**, London, v.32, p.424-429, 1991.

JENSEN-WAERN, M. ; LIDBERG, R. ; JOHANNISSON, A. ; MELIN, L. ; WALLGREN, P. Dietary zinc oxide in weaned pigs – effects on performance tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. **Research in Veterinary Sci.**, London, v. 64, p. 225-231, 1998.

JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R. ; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 66, n. 10, p. 200-4204, 2000.

JONSSON, E., BJORCK, L., CLAEISSON, C.O. Survival of orally administered *Lactobacillus* strains in the gut of cannulated pigs. **Livestock Production Sci.**, Amsterdam, v.12, n.3, p.279-285, 1985.

KIM, I.H., HANCOCK, J.D., HINES, R.H., KIM, C.S. Effects of cellulase enzymes and bacterial feed additives on the nutritional value of sorghum grain

for finishing pigs. **Asian Australian Journal of Animal Sci.**, v.11, n.5, p. 538- 544, 1998.

LIMA, G.J.M.M. Uso de aditivos na produção de suínos. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal. **Anais**. Piracicaba, p. 51-68, 1999.

MAHAN, D.C. & CERA, K.R. Changes in intestinal morphology – a major reason for the growth check following weaning. **Agricultural Research and Development Center**, Ohio, v. 92, n. 2, p. 18-25, 1993.

McORIST, S., MacINTYRE, N., STOKES, C. R., LAWSON, G. H. K. Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 60, n. 10, p. 4184-4191, 1992.

MILLER, B.G. ; JAMES, P.S. ; SMITH, M.W. ; BOURNE, F.J. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. **Journal Agriculture Sci.** Cambridge, v. 107, p. 579, 1986.

MINNEY, S. Probiotics - The success story. **Journal Chemical Biotechnology**, London, v.51, n.4, p.557-559, 1991.

- MITAL, B.K.; GARG, S.K. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton Fl, v.21, n.3, p.175-214, 1995.
- MONTES, A.J. , PUGH, D.G. The use of probiotics in food animal practice. **Veterinary Medicine**, Praha, v.2218, n.3, p.282-288, 1993.
- MORENO, Q. A., LEIDENZ, H.N., SOLANO, P.N., URDANETA, R.E. Effect of probiotics and sex on growth and carcass characteristics of pigs. **Revista Cientifica**, Montevideo, v.6, n.1, p.5-12, 1996.
- MURALIDHARA, K.S., SHEGGEBY, G.G., ELLIKER, P.R., ENGLAND, D.C., SANDINE, W.E. Effect of feeding *Lactobacilli* on the coliform and *Lactobacillus* flora of intestinal tissue and feces from piglets. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.40, n.5, p. 288-295, 1977.
- NABUURS, M. J. A.; HOOGENDOORN, A.; Van der MOLEN, E.J.; Van OSTA, A. L. M.. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared various circumstances in the Netherlands. **Research in Veterinary Sci.**, London, v. 55, n. 1, p. 78-83, 1993.

NABUURS, M. J. A.; HOOGENDOORN, A.; VANZIJDERVERELD – VANBEMMEL, A.; Effect of supplementary feeding during the sucking period on net absorption from the small intestine of weaned pigs. **Research in Veterinary Sci.**, v. 61, p. 72-77, 1996.

NOUSIAINEN, J. Comparative observations on selected probiotics and olaquinox as feed additives for piglets around. Effect on villus length and depth in the jejunum, ileum caecum and colon. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 66, n. 3, p. 224-230, 1991.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, p. 43-52, 1999.

OUWEHAND, A. C.; TOLKKO, S.; KULMALA, J.; SALMINEN, S.; SALMINEN, E. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 82-86, 2000.

PAIGE, J. C.; TOLLEFSON, L.; MILLER, A. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. **Veterinary clinics of**

North America: Food Animal Practice, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 31-43, 1999.

PEDERSEN, K. & TANNOCK, G.W. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by Lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.55, n.2, p.279-283, 1989.

PIVA, A.; MORELLI, L. Role of swine isolated *Lactobacillus reuteri* and *L. acidophilus* on the microbial ecology and fermentation pattern in the gastrointestinal tract of the adult pig. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, Bologna, v.23, n.3., p.147-155, 1997.

REDDY, ROTH, EIGEL, PEIRSON. Probiotics. **Journal Food Protec Ames.**, v. 51, p. 71-72, 1988.

RIBEIRO, P. R. **Efeito da adição de diferentes níveis de ácido fumárico na ração de suínos sobre o desempenho e morfologia duodenal.** Jaboticabal , 1996. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Faculdade Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

RODAS, B. Z.; GILLIAND, S. E.; MAXWELL, C. V. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in suine with hypercholesterolemia induced by diet. **Journal of Dairy Sci.**, v. 79, p. 2121-2128, 1996.

ROJAS, M. & CONWAY, P. L. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, p.474-480, 1996.

ROTHKOTTER, H. J., HRIESIK, C., BERMAN, N. M., PABST, R. B and also T lymphocytes migrate via gut lymph to all lymphoid organs and the gut wall, but only IgA + cells accumulate in the lamina propria of the intestinal mucosa. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 29, n. 1, p. 327-333, 1999.

SALMON, H. The mammary gland and neonato mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 72, p. 143-155, 1999.

SARRA, P.G., CANTALUPO, R., MASSA, S., TROVATELLI, L.D. Colonization of the gastrintestinal tracts of conventional piglets by

Lactobacillus strains. **Journal Genetic Applied Microbiol.**, v.37, p.219-223, 1991.

SCHOLTEN, R. H. J.; Van der PEET-SCHWERING, C. M. C.; VERSTEGEN, M. W. A.; den HARTOG, L. A.; SCHRAMA, J. M.; VESSEUR, P. C. Fermented co-products and fermented compound diets for pigs: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 82, p. 1-19, 1999.

SEVERO, M.P.F. Resíduos em produtos de origem animal no Brasil: o papel do Ministério da Agricultura e Abastecimento: **Anais**, p. 31-44, 1999.

SMITH, J. Biotechnology group meeting probiotics - fact or Fiction? **Journal Chemical Technology Biotechnology**, London, v.51, n.4, p.539-540, 1991.

SONCINI, R. A. Restrições do uso de aditivos na alimentação animal. Expectativa da Agroindústria. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal: **Anais**. Piracicaba, p. 99-104, 1999.

- SPENSER, R. J. & CHESSON, A. . The effect of *Lactobacilus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. **Journal of Applied Bacteriology, Oxford**, v.77, p.215-220, 1994.
- TANNOCK, G.W., FULLER, R. and PEDERSEN, K. *Lactobacilus* Succession in the Piglet Digestive Tract Demonstrated by Plasmid Profiling **Applied and Environ Microbiology**, v.56, n.5, p.1310-1316, 1990.
- TANNOCK, G.W., SZYLIT, O., DUVAL, Y., RAIBAUD, P. Colonization of tissue surfaces in the gastrintestinal tract of gnotobiotic animals by *Lactobacillus* strains. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.28, p. 1196-1198, 1982.
- TIZARD, R. **Imunologia veterinária: uma tradução**. 5ª ed., São Paulo: Roca, 1998. 545 p.
- VALVERDE, C. E. T. C. **250 rações balanceadas para suínos**. Guaíba: Agropecuária, 1997. 114 p.

- VASSALO, M., FIALHO, E.T., OLIVEIRA, A.I.G.-de, TEIXEIRA, A S., BERTECHINI, A G. Probiotics for piglets from 10 a 30 kg liveweight. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n.1, p. 131-138, 1997.
- VERDES, N. Probiotics and the immune status. **Revista Romana de Medicina Veterinária.**, v.6, n. 1, p. 47-52, 1996.
- WITTE, W.; JORSAL, S.E.; ROTH, F.X.; KIRCHGESSNER, M.; GORANSSON, L.; LANGE, S.; PEDERSEN, K.B. Future strategies with regard to the use of feed without antibiotic additives in pig production. **Pig News and Information**, New York, v. 21, n. 1, p. 27N-32N, 2000.
- WU, Guo Yao; MEIER, S.A.; KNABE, D.A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, n. 10, p. 2578-2584, 1996.
- YUSTE, P., SOHN, K.S., FAKLER, T.M., GILLILAND, S.E., MAXWELL, C.V. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on the performance of early-weaned pigs. **Animal Science Research Report**, Stillwater, v.136, p.52-55, 1992.

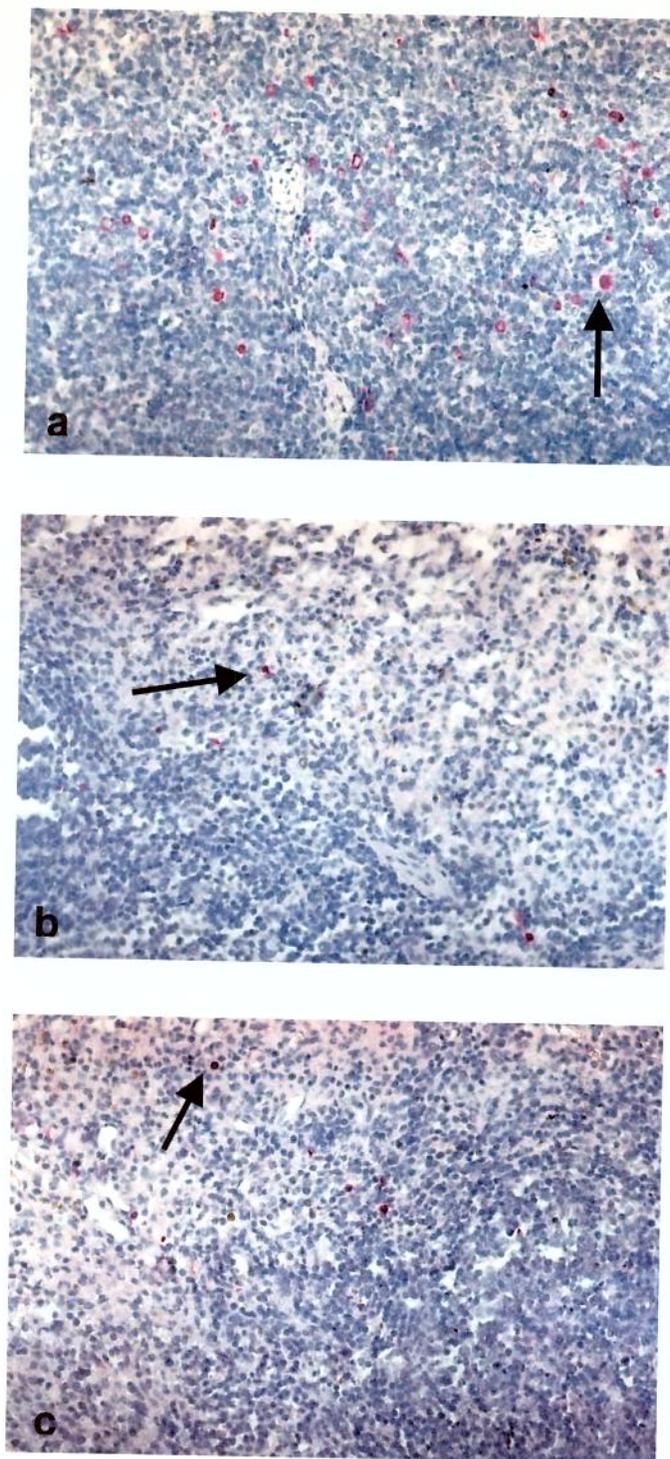


Figura 5 – Linfonodo mesentérico evidenciando células IgA – positivas, pela reação de imuno-histoquímica. Observar em a – grupo de tratamento (P_2), com maior quantidade de células reativas; em b – grupo de tratamento P_1 , e c – grupo de controle (C), ambos com reduzido número de células reativas. Fosfatase alcalina, revelação pelo fast red – naftol, coloração de fundo com hematoxilina de Mayer (200X).

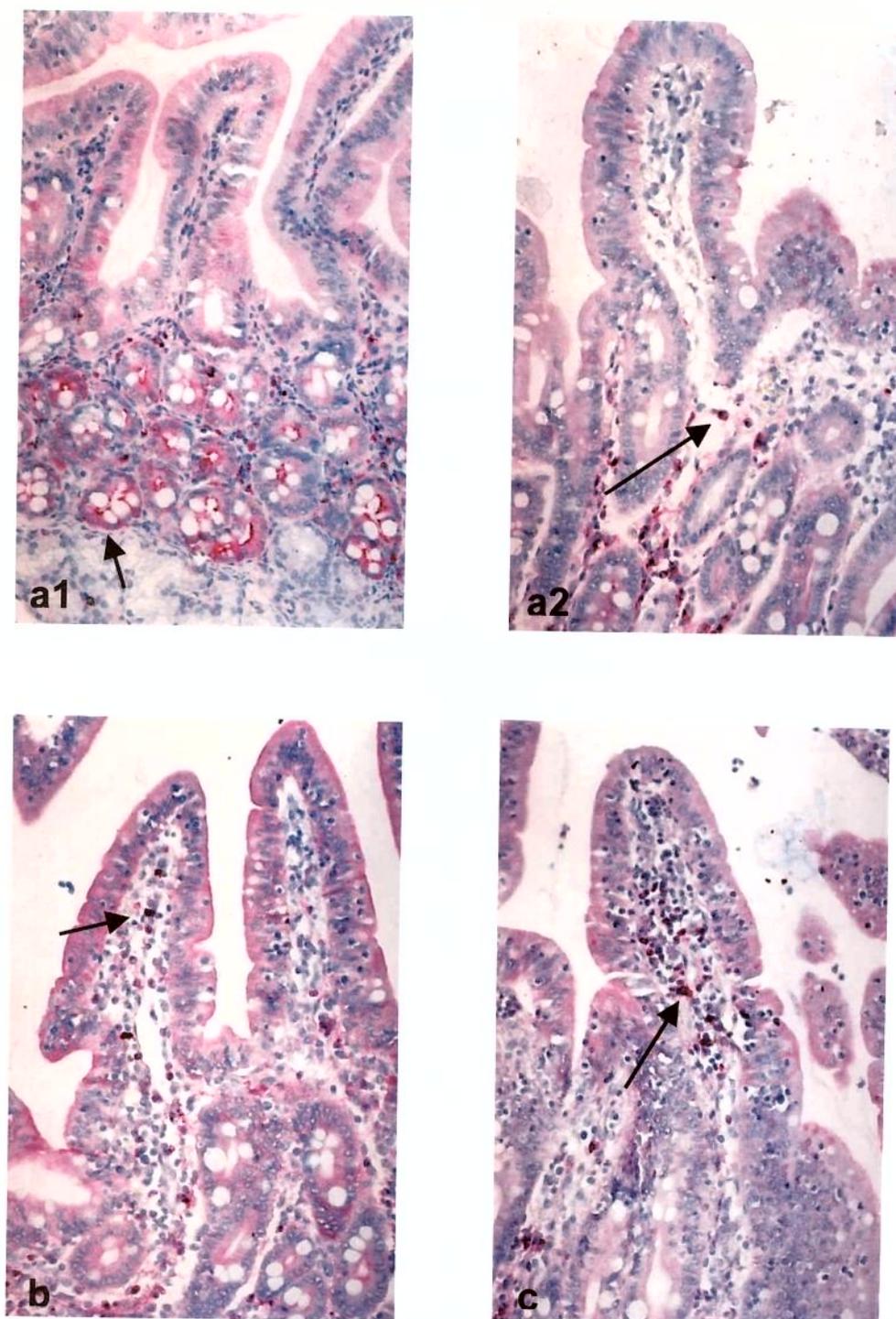


Figura 6 – Mucosa do duodeno evidenciando células IgA – positivas na lâmina própria, pela reação de imuno-histoquímica. Observar em a1 e a2 – grupo de tratamento (P2); em b – grupo de tratamento (P1); e c – grupo de controle (C). A imunomarcagem das células reativas é intensa e de forma semelhante em todos os grupos. Fosfatase alcalina, revelação pelo fast red – naftol, coloração de fundo com hematoxilina de Mayer (200 X).

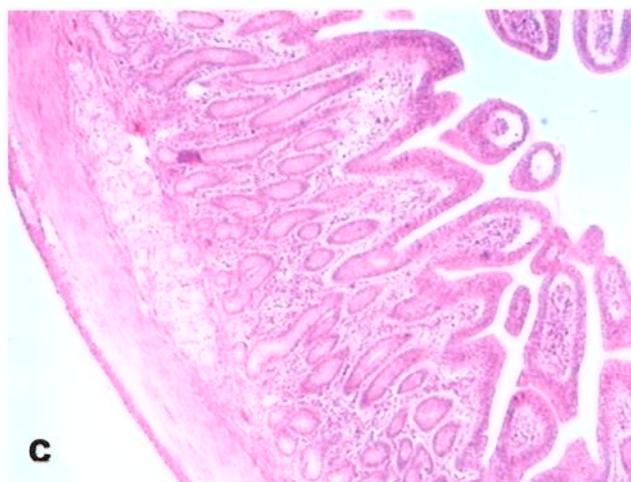
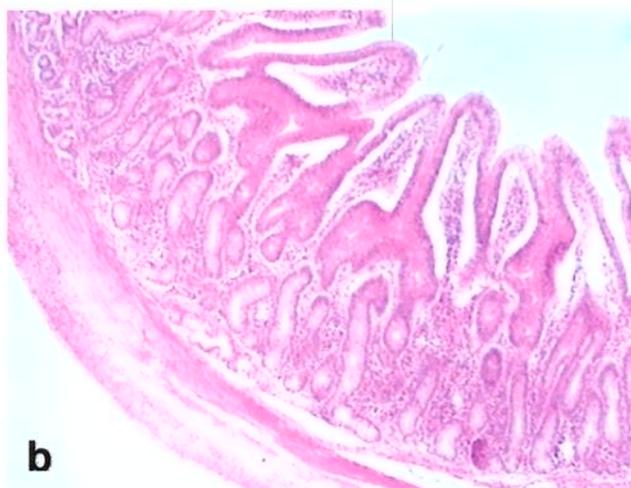
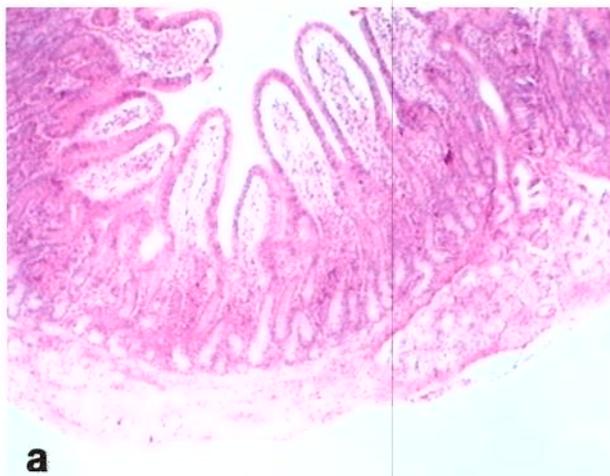


Figura 7 – Fotomicrografias das vilosidades do duodeno de leitões aos 30 dias. Grupos a(P2), b(P1) e c(C). Coloração por Hematoxilina-Eosina (40X).

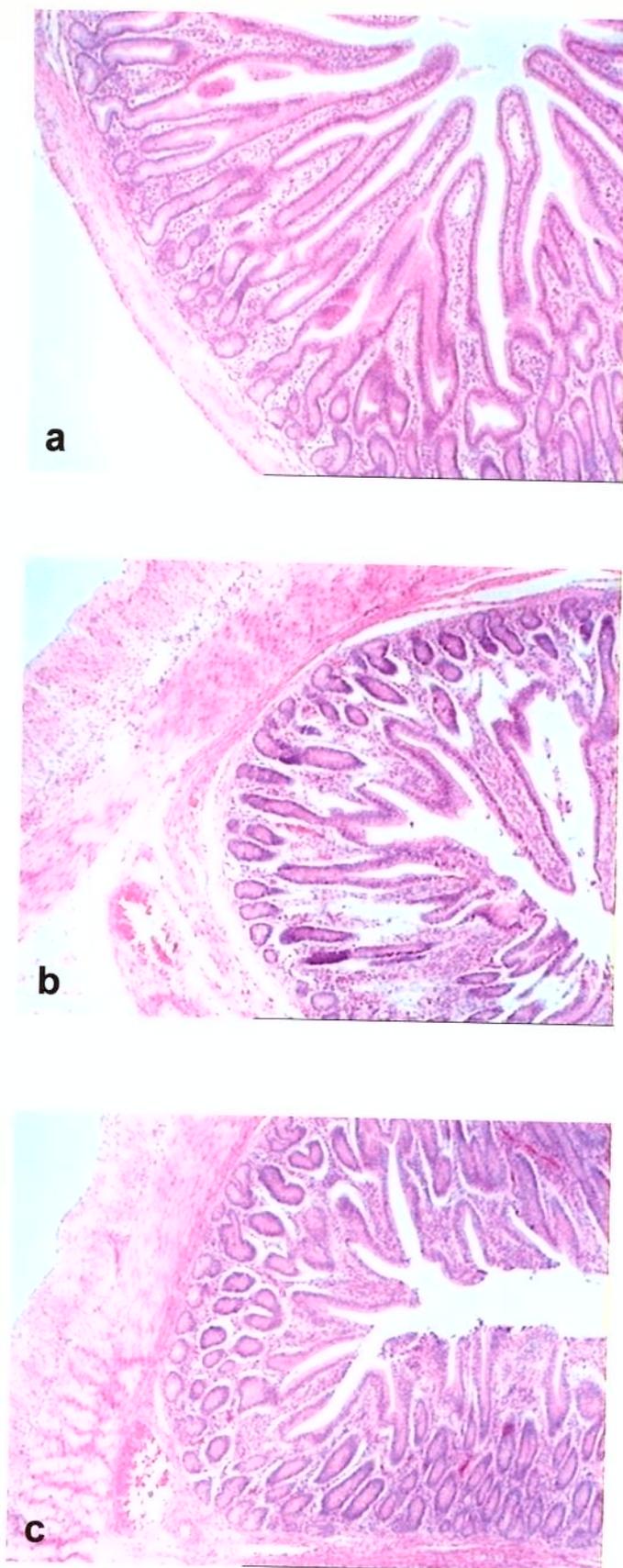


Figura 8 – Fotomicrografias das vilosidades do jejuno de leitões aos 30 dias. Grupos a(P2), b(P1) e c(C). Coloração por Hematoxilina – Eosina (40X).

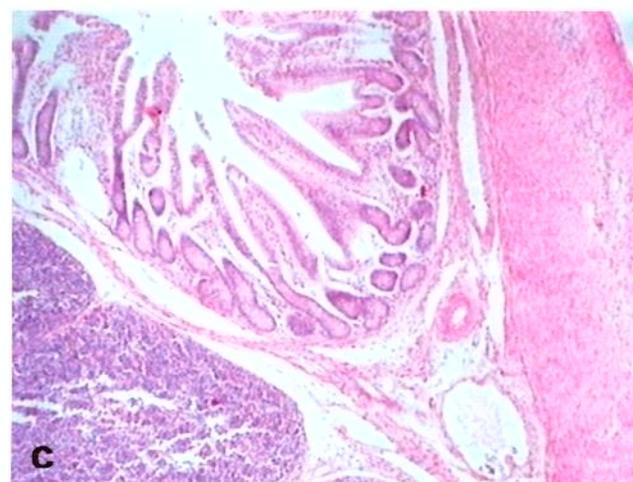
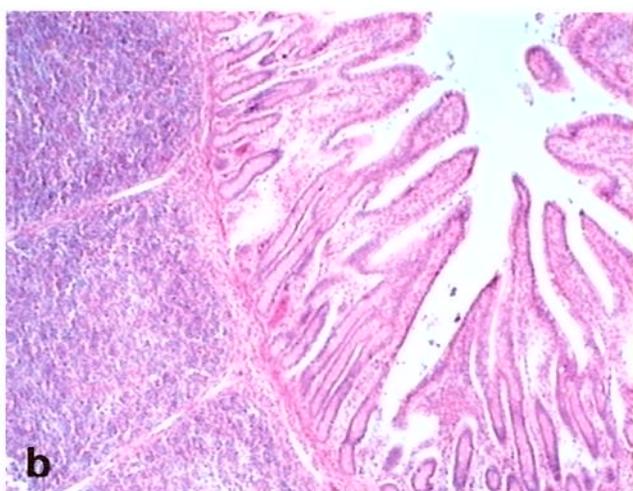
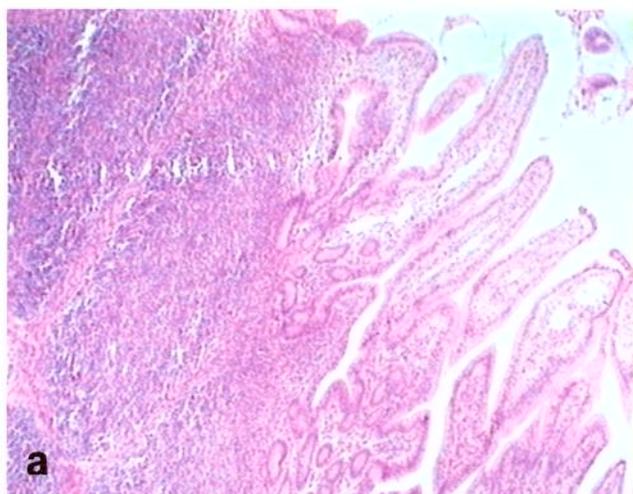


Figura 9 – Fotomicrografias das vilosidades do íleo de leitões aos 30 dias. Grupos a(P2), b(P1) e c(C). Coloração por Hematoxilina – Eosina (40X).

Medidas de altura (AV) das vilosidades das criptas do duodeno

altura	Duodeno		
	C	P1	P2
1	456,64	478,92	344,31
2	406,17	389,27	325,33
3	359,95	314,67	359,83
4	333,03	353,88	331,76
5	398,97	361,39	310,38
6	246,14	437,36	367,74
7	318,43	433,67	274,09
8	294,17	338,49	312,54
9	363,19	344,35	327,48
10	151,91	426,48	477,18
media	332,86	387,848	343,064
desvio	87,36169	53,62091	54,07933
11	450,29	296,94	482,78
12	375,88	337,96	703,66
13	451,44	300,95	664,34
14	463,3	283,06	747,31
15	360,13	412,66	481,71
16	324,15	363,55	584,03
17	428,84	413,6	315,45
18	390,84	383,77	669,68
19	350,18	360,52	340,81
20	557,65	458,4	275,16
media	415,27	361,141	526,493
desvio	69,14248	57,50599	172,9049
21	275,57	419,64	492,06
22	252,63	484,35	512,05
23	341,6	277,81	477,05
24	245,23	417,07	384
25	464,12	267,42	345,83
26	346,53	435,66	448,95
27	319,2	517,08	497,11
28	301,33	388,56	441,72
29	350,17	455,79	536,05
30	401,21	463,74	464,67
media	329,759	412,712	459,949
desvio	67,45072	82,30667	58,19253
MEDIA	359,2963	387,2337	443,1687
DESVPAD	48,49941	25,79099	92,85868

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de largura (L) das vilosidades das criptas do duodeno

largura	Duodeno		
	C	P1	P2
1	265,22	238,32	165
2	267,86	123,72	100,75
3	269,02	212,79	134,53
4	179,09	193,6	166,03
5	185,77	167,77	166,42
6	233,23	149,47	164,86
7	156,27	188,2	149,73
8	246,6	132,5	151,01
9	253,58	218,82	163,59
10	226,71	241,37	254,02
media	228,335	186,656	161,594
desvio	40,83263	42,2482	38,44045
11	188,46	113,68	108,06
12	127,27	136,7	83,18
13	169,04	123,36	103,45
14	178,8	161,57	91,41
15	136,55	144,56	92,11
16	106,37	124,59	96,17
17	117,77	195,05	96,51
18	152,41	132,69	90,5
19	150,39	132,68	93
20	178,08	154,81	100,61
media	150,514	141,969	95,5
desvio	28,09279	23,62234	7,14757
21	145,31	131,54	117,62
22	123,85	126,27	152,57
23	185,93	114,95	152,33
24	166,37	144,63	137,25
25	151,12	130,28	163,6
26	102,71	118,72	147,87
27	102,98	137,11	105,62
28	91,88	150,1	151,95
29	175,12	161,82	183,09
30	165,57	197,94	145,05
media	141,084	141,336	145,695
desvio	33,61491	23,19916	20,78477
MEDIA	173,311	156,6537	134,263
DESVIO	47,88488	25,98471	34,49815

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de profundidade (PC) das vilosidades das criptas do duodeno

Duodeno			
Profundidade	c	t1	t2
1	477,55	469,67	386,87
2	625,06	389,24	293,7
3	585,85	541,55	343,06
4	602,62	591	510,9
5	613,06	518,28	584,4
6	551,5	508,55	606,4
7	672,52	411,75	660,38
8	732,47	421,86	636,2
9	583,45	528,46	624,12
10	631,88	479,97	417,38
media	607,596	486,033	506,341
desvio	68,20932	60,62728	135,2583
11	560,28	474,46	464,91
12	625,83	475,53	608,04
13	479,98	416,98	528,62
14	514	448,09	600,87
15	574,06	386,8	476,7
16	572,61	505,53	399,46
17	465,99	408,69	293,28
18	474,36	381,52	419,44
19	500,56	283,19	385,75
20	535,61	390,77	407,28
media	530,328	417,156	458,435
desvio	52,39313	63,56482	98,96443
21	629,28	295,56	433,51
22	518,81	300,14	397,4
23	586,48	285,22	405,58
24	664,21	480,63	442,72
25	425,56	411,73	264,57
26	480,8	455,4	338,42
27	407,41	675,25	635,88
28	396,43	749,26	421,11
29	495,98	705,73	496,93
30	460,56	690,78	334,72
media	506,552	504,97	417,084
desvio	93,01305	185,3957	101,0734
MEDIA	548,1587	469,3863	460,62
DESV	52,82918	46,21318	44,6686

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de altura (AV) das vilosidades das criptas do jejuno

Altura	Jejuno		
	C	P1	P2
1	301,82	332,23	262,34
2	465,44	369,82	484,11
3	563,66	352,28	320,68
4	287,3	389,56	296,43
5	253,18	517,53	619,77
6	350,66	419,62	468,56
7	391	420,83	424,2
8	210,71	428,1	633,03
9	249,88	242,68	477,21
10	263,36	336,75	423,58
media	333,701	380,94	440,991
desvio	110,8356	73,35519	125,0093
11	383,21	375,94	402,14
12	391,7	440,62	703,55
13	250,89	214,06	478,22
14	223,15	342,88	589,61
15	309,93	341,56	580,02
16	259,7	326,24	468,9
17	236,01	332,84	572,6
18	450,47	314,56	450,76
19	459,2	328,75	574,26
20	301,3	216,01	550,63
media	326,556	323,346	537,069
desvio	88,44538	67,41414	87,50625
21	303,83	270,25	325,09
22	279,36	291,32	296,95
23	405,24	396,43	371,56
24	396,25	340,25	353,24
25	183,5	261,65	293,2
26	240,65	300,19	332,82
27	282,46	301,62	492,37
28	390,88	290,05	304,54
29	256,33	283,78	320,38
30	246,82	380,64	370,56
media	298,532	311,618	346,071
desvio	75,39181	45,7866	58,60702
MEDIA	319,5963	338,6347	441,377
DESV	18,58877	37,10381	95,49959

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de largura (L) das vilosidades das criptas do jejuno

		Jejuno		
Largura		C	P1	P2
1		125,51	191,08	114,22
2		124,62	104,07	102,27
3		122,73	123,33	130,43
4		287,3	120,46	144,84
5		98,5	156,4	118,64
6		157,8	96,94	138,62
7		126,34	114,7	142
8		86,72	96,94	157,48
9		116,3	85,76	135,33
10		141,23	130,25	124,73
media		138,705	121,993	130,856
desvio		55,83002	31,57307	16,29496
11		136,06	166,32	122,27
12		125,33	95,38	89,05
13		147	122,5	116,18
14		114,31	103,16	98,06
15		125,01	126,54	137,7
16		106,05	114,18	156,43
17		126,8	87,58	123,85
18		160	110,3	111,37
19		141,53	90,35	98,6
20		141,54	132,04	97,95
media		132,363	114,835	115,146
desvio		16,03027	23,61879	20,80944
21		75,33	135,87	81,62
22		79,23	167,95	72,48
23		130,65	90,78	84,41
24		78,62	111,4	82,8
25		71,16	147,48	86,04
26		73,87	115,18	141,83
27		80,46	117,62	147,07
28		103,11	139,4	107,61
29		92,26	127,17	103,77
30		96,6	130,01	130,06
media		88,129	128,286	103,769
desvio		18,27201	21,35485	27,13741
MEDIA		119,7323	121,7047	116,5903
DESV		27,55237	6,730134	13,60114

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de profundidade (PC) das vilosidades das criptas do jejuno

Jejuno			
Profundidade	C	P1	P2
1	233,9	448,07	466,35
2	351,23	322,83	296,68
3	314,09	433,44	230,66
4	292,34	346,88	347,4
5	232,74	275,5	308,64
6	221,4	401,09	227,25
7	226,07	464,67	249,44
8	137,11	396,32	312,38
9	259,9	342,4	328,62
10	145,5	476,51	288,77
media	241,428	390,771	305,619
desvio	67,59607	66,85215	69,47775
11	341,11	171,73	356,68
12	165,07	332,91	284,74
13	294,9	359,28	397,89
14	389,12	329,06	375,08
15	389,12	271,18	274,23
16	459,54	244,76	148,15
17	300,3	248,9	252,15
18	352,21	225,27	191,11
19	266,17	287,48	243,3
20	451,35	365,51	217,76
media	340,889	283,608	274,109
desvio	89,01814	63,01149	81,51959
21	362,85	507,13	340,07
22	414,74	417,18	252,34
23	294,95	391,92	174,7
24	254,95	316,63	270,7
25	426,5	373,86	265,6
26	422,46	290,45	241,64
27	436,56	277,25	200,17
28	204,78	224,44	288,51
29	439,43	470	344,41
30	418,76	287,77	335,32
media	367,598	355,663	271,346
desvio	85,46237	91,40817	57,86209
MEDIA	316,6383	343,3473	283,6913
DESV	66,48901	54,63272	19,0401

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de altura (AV) das vilosidades das criptas do íleo

Altura	íleo		
	C	P1	P2
1	434,91	286,73	264,07
2	285,53	393,06	313,65
3	320,65	305,02	292,32
4	198,65	311,92	509,43
5	288,16	366,66	301,27
6	279,68	304,91	311,77
7	324,82	329,82	319,85
8	280,7	250,4	429,68
9	262,25	369,92	415,09
10	194,23	382,09	308,41
media	286,958	330,053	346,554
desvio	67,95535	46,44752	77,74027
11	298,41	302,05	464,33
12	239,09	212	465,17
13	194,03	402,15	429,98
14	219,04	358,32	521,28
15	219,84	360,74	624,17
16	390,76	346,15	645,84
17	335,95	276,26	330,12
18	295,31	287,77	437,44
19	251,75	395,22	604,65
20	214,12	367,85	575,84
media	265,83	330,851	509,882
desvio	62,80629	59,87859	101,6685
21	218,6	315,45	352,57
22	366,07	444,7	278,94
23	391,61	380,5	294,02
24	253,09	411,56	311,23
25	212,08	250,06	379,66
26	250,43	270,35	494
27	247,61	289,04	291,16
28	255,15	256,9	367,8
29	245,66	360,12	261,83
30	216,7	363,41	268,68
media	265,7	334,209	329,989
desvio	62,05223	67,81201	71,07914
MEDIA	272,8293	331,7043	395,475
DESV	12,23596	2,205497	99,42495

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de largura (L) das vilosidades das criptas do íleo

largura	íleo		
	C'	P1	P2
1	73,6	143,65	118,04
2	70,92	144,7	119,7
3	91,41	120,27	120,42
4	82,87	128	128,6
5	99,48	98,6	98,9
6	88,48	78,88	137,61
7	73,5	102,72	120,23
8	123,31	108,71	112,93
9	107,69	146,72	113,74
10	127,26	85,85	105,84
media	93,852	115,81	117,601
desvio	20,3106	24,74982	10,88102
11	92,09	142,61	152,56
12	104,82	112,53	151,93
13	108,94	123,77	137,31
14	85,6	156,7	130,86
15	88,9	208,02	150,92
16	88,78	107,61	173,4
17	97,35	103	149,65
18	109,86	130,33	153,61
19	122,85	123,2	142,38
20	104,15	122,06	115,06
media	100,334	132,983	145,768
desvio	11,85399	30,82884	15,63111
21	86,28	162	80,87
22	102,2	147,3	121,86
23	174,25	110,6	115,16
24	107,58	97,87	151,2
25	100,61	123,17	94,22
26	78,5	140,91	90,43
27	84,02	127,72	127,27
28	125	125,76	180,7
29	140,7	140,09	93,45
30	162,08	116,34	75,81
media	116,122	129,176	113,097
desvio	33,363	18,86341	33,31493
MEDIA	103,436	125,9897	125,4887
DESV	11,45448	9,019009	17,70621

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas

Medidas de profundidade (PC) das vilosidades das criptas do íleo

Íleo			
profundidade	C	P1	P2
1	121,93	150,31	235,41
2	195,09	203,03	219,53
3	233,89	283,93	241,51
4	173,66	304,94	326,4
5	304,28	241,52	337,35
6	274,01	120,4	322,8
7	383,15	239,6	448,76
8	289,68	281,3	175,12
9	240,65	268,32	188,66
10	182,6	293,6	307,03
media	239,894	238,695	280,257
desvio	75,96743	62,5641	83,63472
11	247,94	240,41	250,66
12	200,87	236,32	267
13	289,4	225,7	250,04
14	311,4	198,84	254,52
15	193,2	86,23	346,65
16	240,77	265,71	335,4
17	215,6	272,77	378,8
18	322,6	327,8	330,2
19	373,43	265,22	281,8
20	365,6	246,32	152,51
media	276,081	236,532	284,758
desvio	66,08245	62,85521	65,3198
21	305,35	293,44	228,81
22	399,9	298,98	274
23	396,27	151,63	367,23
24	431,75	344,22	259,18
25	433,66	272,83	280,61
26	435,66	244,3	234,98
27	388,93	244,3	161,22
28	355,31	247,8	163,05
29	218,6	264,94	249,16
30	285,25	313,02	242,33
media	365,068	267,546	246,057
desvio	73,31519	52,22523	59,03011
MÉDIA	293,681	247,591	270,3573
DESV	64,41624	17,31534	21,1647

C – grupo controle

P1 – Tratamento
com células
inativadas

P2 – tratamento
com células
vivas