

GRAZIELA ALVES DA CUNHA VALINI

**NUCLEOTÍDEOS COMO ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS PROMOTORES
DE CRESCIMENTO EM DIETAS PARA LEITÕES DESMAMADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae

Orientador: Gabriel Cipriano Rocha

Coorientadores: Arele Arlindo Calderano
Marcio de Souza Duarte

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V173n Valini, Graziela Alves da Cunha, 1994-
2019 Nucleotídeos como alternativa aos antibióticos promotores
de crescimento em dietas para leitões desmamados / Graziela
Alves da Cunha Valini. – Viçosa, MG, 2019.
50 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Gabriel Cipriano Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-34.

1. Leitões - Alimentação e rações. 2. Nucleotídeos.
3. Leitões - Crescimento. 4. Microbiota. 5. Morfologia
(Animais). 6. Leitões - Registros de desempenho.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

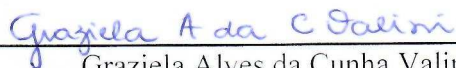
CDD 22. ed. 636.40855

GRAZIELA ALVES DA CUNHA VALINI

**NUCLEOTÍDEOS COMO ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS PROMOTORES
DE CRESCIMENTO EM DIETAS PARA LEITÕES DESMAMADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2019.



Graziela Alves da Cunha Valini
Autora



Gabriel Cipriano Rocha
Orientador

Em especial ao meu avô, João Alves da Cunha, o qual sempre me apoiou e me ensinou que é através do estudo que se atingem os objetivos e torna o mundo melhor.

À minha família, cuja confiança a mim depositada, me deram forças e determinação para concluir mais esta etapa da vida.

A vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar! Pela vida, e por todas as oportunidades e desafios a mim concedidos.

Agradeço aos meus pais Maria Cristina e Carlos Eduardo, que nunca mediram esforços para a realização de minhas conquistas, além da dedicação, paciência e companheirismo em todos os momentos, sempre me mostrando que tudo é possível se for realizado com amor. Ao meu irmão, Guilherme e minha cunhada Janaína, que sempre torceram pelo meu crescimento profissional e pessoal.

À minha avó, Ivone, por sempre ser a minha segunda mãe em todos esses anos.

Ao meu esposo, João Rafael, pela cumplicidade e amizade, fazendo os meus dias mais felizes, obrigada por todo carinho e compreensão.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por proporcionarem a realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores, em especial o professor Gabriel, pela orientação, conhecimento e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A todos os funcionários do Setor de Suinocultura, Fernando, Dedeco, Leandro e Arlindo, pela amizade e ajuda na execução desse projeto.

Aos meus estagiários/“filhos”/amigos Lucas, Caroline, Stefani e Nathana, obrigada por se dedicarem a este projeto e por segurarem minha mão em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios (em especial Sofia, Marlon e Juliana) e ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (em especial Kenner e Renata) por abrirem as portas do “lab” para a realização das análises deste projeto, por todos os ensinamentos e amizade.

As minhas amigas de longa data Amanda, Gabriela, Barbara e Fabiana, pelo carinho, compreensão e “socorros” mesmo a distância! Sem vocês as experiências vividas não teriam sido tão intensas e gratificantes.

Agradeço aos amigos que Viçosa me deu Joyce, Rizielly, Bruna, Livia, Gustavo, Marcos, Matheus, Warley, Pedro, Dante e Maykelly. Obrigada pelo apoio, abraços, estudos e companheirismo. Obrigada por tornarem a pós-graduação mais leve e divertida.

A vocês, muito obrigada!

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro”*

Fernando Sabino

RESUMO

VALINI, Graziela Alves da Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Nucleotídeos como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento em dietas para leitões desmamados.** Orientador: Gabriel Cipriano Rocha. Coorientadores: Arele Arlindo Calderano e Marcio de Souza Duarte.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da inclusão de nucleotídeos purificados em substituição ao uso de antibiótico, em dietas para leitões sobre desempenho e saúde intestinal. Foram utilizados 96 leitões, com peso médio inicial de $7,44 \pm 0,65$ kg distribuídos em delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições. Os três tratamentos foram ração controle (CON), ração CON + 2 kg/ton de um aditivo comercial com nucleotídeos purificados (NUC) e ração CON + 0,6 kg/ton de um antibiótico promotor de crescimento comercial com colistina (ATB). Não foi observado efeito ($P > 0,05$) de nucleotídeos e antibiótico sobre o consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), peso médio aos 35 dias e escore fecal. A suplementação de NUC teve efeito similar ao ATB ($P < 0,05$) e superior ao CON no aumento da proliferação celular do duodeno, contagem de linfócitos do jejuno, altura de vilosidades, profundidade de cripta e na redução da área celular das células de Paneth. A abundância relativa de mRNA de MAPK-6, Haptoglobina, TNF- α e ICAM-1 não foi influenciada ($P > 0,05$) pela inclusão de NUC e ATB nas rações. Na quantificação microbiana ileal, animais suplementados com NUC tiveram maior contagem de enterobactérias ($P < 0,05$) em relação aos animais CON e suplementados com ATB. Entretanto, no cólon NUC e ATB reduziram ($P < 0,05$) a quantificação bacteriana total, quando comparado ao CON. Estes resultados sugerem que o efeito dos nucleotídeos purificados em leitões no pós-desmame se dá pela modulação do trato digestivo, através da estimulação da resposta imune local e de uma ação trófica na mucosa intestinal, e por isso, pode ser uma alternativa ao uso de antimicrobianos como promotor de crescimento.

Palavras-chave: Nucleotídeos. Leitões. Microbiota. Morfologia intestinal. Promotor de crescimento.

ABSTRACT

VALINI, Graziela Alves da Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Nucleotides as an alternative to antibiotics as growth promoters in weaned piglets.** Advisor: Gabriel Cipriano Rocha. Co-advisors: Arele Arlindo Calderano and Marcio de Souza Duarte.

The current study aimed to evaluate the short-term effect of purified dietary nucleotides on performance and gut health of weaned pigs. Ninety-six piglets 21 days-old, weighing 7.44 ± 0.65 kg were allocated into 1 of 3 treatments (8 pens per treatment; 4 pigs per pen) based on body weight. Dietary treatments consisted of CON: corn-soybean meal based diet; NUC: CON + 2 kg/ton of nutritional nucleotide additive; and ATB: CON + 0.6 kg/ton commercial growth promoter based on colistin. In this experiment, the average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG) gain:feed ratio (G:F), body weight (35 d) and the fecal score was not affected ($P>0.05$) by supplementing NUC or ATB. Dietary NUC had a similar effect to ATB and superior to CON ($P<0.05$) on enhancing duodenal cell proliferation, jejunum lymphocyte counting, villus height, crypt depth, and reduction of Paneth cellular area. The relative abundance of MAPK-6, Haptoglobin, TNF- α , and ICAM-1 mRNA was not influenced ($P>0.05$) by treatments. In the ileal bacteria quantification, piglets supplemented with NUC showed higher ($P<0.05$) total bacteria and enterobacteria proliferation than CON and ATB. However, NUC and ATB reduced ($P<0.05$) colon total bacteria quantification when compared to CON treatment. These results suggest that supplementing purified nucleotides to weaned piglets improved gut health by modulating the local immune response and modulating intestinal mucosa development and, therefore, nucleotides may be an alternative to antibiotics as growth promoter.

Key words: Nucleotides. Piglet. Gut Microbiota. Intestinal morphology. Growth promoters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Imagem representativa dos cortes histológicos para mensuração da altura de vilosidade e profundidade de cripta. A: duodeno. B: jejuno. C: íleo. Os cortes foram corados em azul de toluidina. Ampliação da lente 40x.42
- Figura 2- Imagem confocal representativa mostrando o reconhecimento de células com base na intensidade de fluorescência dos anticorpos. A: marcações anti-CD em verde. B: marcações anti-ki67 em vermelho e anti-cpp32 em verde. Os núcleos das células foram marcados com DAPI. Ampliação da lente 20x.....43
- Figura 3- Efeito de nucleotídeos e antibiótico na área celular (células de Paneth) de leitões 14 dias pós desmame44
- Figura 4- Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de marcações de proliferação celular de leitões 14 dias pós desmame.45
- Figura 5- Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de marcações de apoptose celular de leitões 14 dias pós desmame.....46
- Figura 6- Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de marcações de linfócitos B de leitões 14 dias pós desmame.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de iniciadores utilizados na análise de expressão gênica relativa tecidual por RT-qPCR	35
Tabela 2 – Lista de iniciadores utilizados na quantificação bacteriana por análise de qPCR (sequências de 16S rDNA)	36
Tabela 3- Efeito dos níveis de nucleotídeos e antibiótico no desempenho de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.	37
Tabela 4- Efeito de nucleotídeos e antibiótico na morfometria intestinal (duodeno, jejuno e íleo) de leitões 14 dias pós-desmame	38
Tabela 5- Abundância relativa de mRNA de marcadores inflamatórios no jejuno de leitões 14 dias pós-desmame.....	39
Tabela 6- Efeito de nucleotídeos e antibiótico na microbiota intestinal (em log ₁₀ 16S rRNA número de cópias/g) de leitões 14 dias pós-desmame	40

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	11
2. INTRODUÇÃO	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
Animais e Instalações	15
Dietas e desenho experimental.....	16
Desempenho	17
Coleta de amostras intestinais.....	17
Análise histomorfométricas e contagem celular por imunofluorescência	18
Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR.....	19
Extração de DNA, qPCR e quantificação bacteriana.....	20
Análise estatística	22
4. RESULTADOS.....	23
Desempenho, escore fecal e pH intestinal	23
Morfometria intestinal	23
Contagem de células em proliferação ou apoptose e linfócitos B.....	23
Abundância relativa de mRNA intestinal	24
Quantificação microbiana.....	24
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	29
Referências	31
Anexo I.....	48

1. CAPÍTULO I

Capítulo redigido conforme as normas da revista *Animal*

Manuscript Type: ORIGINAL ARTICLE

Nucleotídeos como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento em dietas para leitões desmamados

G. A. C. VALINI¹, C. B. SILVA¹, L. M. TEIXEIRA¹, G. R. AMORIM¹, K. M. FERNANDES², A. A. CALDERANO¹, M. S. DUARTE¹, R. VERONEZE¹, N. V. L. SERÃO^{3,a}, H. C. MANTOVANI² and G. C. ROCHA¹

¹Departament of Animal Science, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil.

²Departament of Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil,

³Department of Animal Science, Iowa State University, Iowa, United States.

^aPresent address: Animal Science, Iowa State University, 239B, Kildee Hall, 50011, Ames Iowa, IA, USA

Corresponding author: Gabriel Cipriano Rocha. E-mail: gcrocha@ufv.br

Implications

The results of this study show that dietary pure nucleotides have the potential to reduce weaning-associated challenges on the piglet gut health. Supplementation of purified nucleotides may be beneficial in mitigating stress in weaned piglets by modulating immune responses, mucosal tissue, and gut bacteria composition. Thus, dietary nucleotide is a good nutritional strategy to help piglets to cope with this transition phase and the challenges associated with free in-feed antibiotics production system.

ABSTRACT

The current study aimed to evaluate the short-term effect of purified dietary nucleotides on performance and gut health of weaned piglets. Ninety-six piglets 21 days-old, weighing 7.44 ± 0.65 kg were allocated into 1 of 3 treatments (8 pens per treatment; 4 pigs per pen) based on body weight. Dietary treatments consisted of CON: corn-soybean meal based diet; NUC: CON + 2 kg/ton of a nutritional additive with purified nucleotides; and ATB: CON + 0.6 kg/ton of a commercial growth promoter based on colistin. In this experiment, the average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG) gain:feed ratio (G:F), body weight (35 d) and the fecal score was not affected ($P > 0.05$) by supplementing NUC or ATB. Dietary NUC had a similar effect to ATB and superior to CON ($P < 0.05$) on enhancing duodenal cell proliferation, jejunum lymphocyte counting, villus height, crypt depth, and reduction of Paneth cellular area. The relative abundance of MAPK-6, Haptoglobin, TNF- α , and ICAM-1 mRNA was not influenced ($P > 0.05$) by treatments. In the ileal bacteria quantification, piglets supplemented with NUC showed higher ($P < 0.05$) total bacteria and enterobacteria proliferation than CON and ATB supplemented piglets. However, NUC and ATB reduced ($P < 0.05$) colon total bacteria quantification when compared to CON. These results suggest that supplementing purified nucleotides to weaned piglets improved gut health by modulating the local immune response and modulating intestinal mucosa development and, therefore, nucleotides may be an alternative to antibiotics as growth promoter.

Keywords: Nucleotides, Piglet, Gut Microbiota, Intestinal morphology, Growth promoters.

2. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados na alimentação animal, como promotores de crescimento, para melhorar a eficiência da produção (Ambrosio et al., 2017) e modular a microbiota intestinal (Angelakis et al., 2013; Martínez, 2017), garantindo o bom funcionamento do sistema imune (Buret, 2010) e da saúde animal. Entretanto, o uso desses antimicrobianos está sendo restringido devido à associação com a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (Ekwanzala et al., 2018). Dessa forma, tem crescido o interesse no uso de aditivos alternativos para garantir a sustentabilidade em longo prazo da produção de suínos (Liu et al., 2017), principalmente, durante o período pós desmame.

Entre as estratégias alternativas ao uso de antibiótico se destacam os nucleotídeos. Estes monômeros são mediadores fisiológicos, constituintes de coenzimas (Domeneghini et al., 2006) e participam do processo de divisão e crescimento celular (Lee et al., 2007), cruciais para as células de rápida proliferação, como da mucosa intestinal e do sistema imune (Sauer et al., 2011). Com isso, o requerimento de nucleotídeos é elevado durante períodos de rápido crescimento, de estresse, e, em animais com sistema imune comprometido (Stein and Kil, 2006). Entretanto, rações a base de milho, farelo de soja e derivados do leite são deficientes em nucleotídeos (Mateo and Stein, 2004) e, por isso, podem ser considerados um nutriente condicionalmente essencial no período pós-desmame.

Estudos têm mostrado os benefícios da suplementação de nucleotídeos na dieta de leitões recém-desmamados no aumento da relação vilo:cripta e altura das vilosidades intestinais (Domeneghini et al., 2004; Martinez-Puig et al., 2007); no estímulo a divisão e diferenciação celular e redução da apoptose (Domeneghini et al., 2004), e também na modulação das respostas imunes inatas, melhorando a

resistência do hospedeiro (Che et al., 2016; Daneshmand et al., 2017). Entretanto, há ainda controvérsias sobre a atuação dos nucleotídeos em leitões recém desmamados na composição e atividade da microbiota intestinal (Andrés-Elias et al., 2007; Sauer et al., 2012b), respostas inflamatórias (Jiao and Kim, 2019), e em situações de desafio sanitário (Superchi et al., 2012; Waititu et al., 2017).

Embora diversos trabalhos demonstrem os benefícios dos nucleotídeos para leitões recém-desmamados, como possível alternativa aos antibióticos, poucos trabalhos têm o antibiótico como um dos tratamentos no delineamento experimental e, portanto, o possível efeito dos nucleotídeos em comparação aos antibióticos ainda não foram esclarecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação de nucleotídeos como alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento em dietas para leitões recém-desmamados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Instalações

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa – UFV, protocolo nº 053/2017, e conduzido nas salas de creche do Setor de Suinocultura, do Departamento de Zootecnia da UFV.

Foram utilizados 96 leitões híbridos comerciais, fêmeas e machos castrados, [AGPIC 415 × Camborough (Agrocere PIC, Patos de Minas, MG, Brazil)] desmamados com 21 dias de idade, com peso inicial de $7,44 \pm 0,65$ kg. Os animais foram alojados em baias metálicas suspensas ($0,35 \text{ m}^2/\text{animal}$), dotadas de um comedouro semiautomático e um bebedouro tipo chupeta, localizadas em galpão de alvenaria com piso de concreto e coberto com telhas de cerâmica. As condições ambientais no interior das salas foram monitoradas diariamente às 16h por meio de

termômetros de máxima e mínima, mantidos em uma baia vazia no centro galpão, a meia altura do corpo dos animais. A temperatura média máxima foi de 28,2°C e mínima de 25,1°C, durante o experimento. O período experimental teve duração de 14 dias (21-35 d).

Antes da entrada dos animais, as gaiolas não foram limpas e desinfetadas após a saída do lote anterior, conforme modelo proposto por Le Floc'h et al., 2006. Para aumentar o desafio sanitário da granja experimental, também foram aplicados sete quilos de fezes das matrizes no piso das baias experimentais (Waititu et al., 2017). As fezes foram coletadas, diluídas em água e aplicadas em metade da área total da baia, oposta ao comedouro.

Dietas e desenho experimental

As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja para atender 3400 kcal/kg de EM e 1,45 g/kg de lisina digestível na fase pré-inicial (21-35d). Os conteúdos de metionina + cisteína, treonina, triptofano e valina digestíveis expressos em porcentagem de lisina digestível foram de 56, 63, 18 e 69%, respectivamente, de acordo com o perfil ideal de aminoácidos recomendado por Rostagno et al. (2011). Os animais foram distribuídos em delineamento de blocos casualizados, com três tratamentos, ração controle (CON), ração CON + 2 kg/ton de Ascogen[®] (NUC) (com 15% de nucleotídeos purificados, 300 mg de nucleotídeos livres/kg de produto, Technofeed LTDA, Vinhedo, São Paulo, Brasil) e ração CON + 0,6 kg/ton de Colistin 80 (ATB) (com 8% de colistina, 48 mg de colistina/ kg de produto, Uniquimica, São Paulo, Brasil), oito repetições e quatro animais por unidade experimental. Ambos os aditivos foram inclusos nas dietas experimentais em substituição ao milho. Durante todo o período experimental, o fornecimento de água e das rações foi à vontade.

Desempenho

As rações fornecidas, as sobras e os desperdícios foram pesados diariamente e os animais pesados individualmente no início (21 d) e aos 14 dias (35 d) experimentais, para determinação do consumo de ração médio diário, (CRD), do ganho de peso médio diário (GPD) e da conversão alimentar (CA). A avaliação do escore fecal (1 = presença ou 0 = ausência de diarreia) foi realizada quatro vezes ao longo do experimento, no 5º, 8º, 11º e 14º dia experimental (26, 29, 32 e 35 dias de idade).

Coleta de amostras intestinais

Ao final do experimento (35 d), um animal de cada unidade experimental, total de 24 animais, com peso mais próximo à média de sua respectiva unidade, foi abatido para avaliação das características histomorfométricas, respostas imunológicas, quantificação bacteriana ileal e cecal e pH intestinal. Após o abate, os animais foram eviscerados por incisão abdominal na linha mediana. A válvula pilórica, a junção íleo-cecal e o cólon proximal foram amarrados para prevenir a mistura de digesta entre os compartimentos. Amostras do conteúdo intestinal foram coletadas em tubos livre de RNase, das porções íleo e colón, e mensuradas seu pH. As leituras de pH foram realizadas no medidor pH-metro de bancada (KASVI K39-1014B, Paraná, Brasil), acoplado a um eletrodo combinado de vidro. Após a mensuração, os tubos foram armazenados a -20°C para posterior quantificação bacteriana.

A identificação e separação de cada segmento do intestino delgado, duodeno (a 10 cm a partir do piloro), jejuno (porção média do intestino) e íleo (a 5 cm anterior a junção íleo-cecal), foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Yang

et al.(2014). Em cada seguimento, um fragmento de aproximadamente três centímetros de comprimento foi retirado, para análise de morfometria intestinal. Imediatamente após a sangria, os fragmentos coletados foram lavados com solução salina (0,9%) e fixados em paraformaldeído (4%) por uma hora. Em seguida, os tecidos foram lavados e mantidos em tampão fosfato (PBS) (pH=7,4) a 4°C até o uso.

Na porção do jejuno, um fragmento a mais de cada animal foi coletado para avaliação das respostas imunes pela expressão dos genes MAPK-6, Haptoglobina (Hp), TNF- α . Todo o material utilizado nesse procedimento foi higienizado com etanol 70% (v/v), e RNase Exterminator. Após a secção, o tecido foi lavado com solução salina (0,9%), para remoção da digesta. Foram retiradas cerca de dez amostras de 0,25 cm², armazenados em criotubos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente acondicionadas a -80°C.

Análise histomorfométricas e contagem celular por imunofluorescência

Os segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram desidratados e emblocados em historesina, de acordo com a metodologia de Gonçalves et al. (2014). Nas análises de histomorfométrica e área celular das células de Paneth, os cortes transversais foram semi-seriados, utilizando 1 a cada 10 cortes, à 3 μ m e coradas com azul de toluidina. Em seguida, de cada lâmina de duodeno, jejuno e íleo, foram fotografadas, 10 campos/animal em microscópio óptico (Fotomicroscópio Monocromático Olympus BX53; objetiva 40x; Figura 1). Desses campos, foram fotografadas e medidas 15 vilosidades e suas respectivas criptas, bem orientadas e seccionadas longitudinalmente. A relação vilo:cripta foi computada. Para mensuração de sua área celular também foram fotografadas 30 células por lâmina. As imagens foram analisadas através do programa Image J(r)1.49r.

Para a contagem de proliferação celular (Anti-ki 67, 1 : 400; Cell Signaling Technology, Cat# 9449), apoptose celular (Anti-cpp3, 1 : 400; Cell Signaling Technology, Cat# 9664) e número de linfócitos B (Anti-CD79A, 1 : 400; Cell Signaling Technology, Cat#3351) na mucosa, em cada lâmina/segmento, 4 cortes/animal, 0,25 μm^2 de área cada, os cortes foram semi-seriados, utilizando 1 a cada 10 cortes, à 7 μm e foram contados em microscópio de fluorescência (Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss, LSM510 META; objetiva 20x; Figura 2).

Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR

A extração do RNA total foi realizada a partir de 50 mg de amostras do jejuno, utilizando TRIzol[®] (InvitrogenTM) segundo as instruções do fabricante. O precipitado final foi reidratado com 30 μL de água UltraPure[®] DNase/Rnase-Free. A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoVue Plus TM (GE Healthcare, Munique, Alemanha), observando-se as razões A260/A280 entre 1.8 e 2.0 como controle de pureza. A qualidade e a integridade do RNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 1%. Na sequência, as amostras (100 ng) foram reversamente transcritas em cDNA utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription (RT) (Promega, Madison, WI), seguindo a recomendação do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o uso na reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Os primers para amplificação dos fragmentos dos genes alvo e endógenos foram desenhados por meio do programa PrimerQuest fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir das sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 1).

Os genes 18S, β -actina e GAPDH foram utilizados em análises de normalização a fim de minimizar as possíveis variações quanto a quantidade de RNAm inicial e a eficiência da transcrição reversa. A escolha do gene endógeno foi baseada na eficiência de amplificação dos genes candidatos a partir do cálculo da eficiência para cada par de primer por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta}) - 1}$, onde E é a eficiência da reação (Pfaffl, 2001) que, para os endógenos testados, variou de 0,81 a 1,10. Nenhum dos endógenos apresentou diferença significativa de expressão entre os tratamentos. Devido à sua maior expressão e estabilidade entre os tratamentos, o gene 18S foi escolhido como melhor gene endógeno.

As RT-qPCR foram efetuadas em duplicata utilizando o termociclador (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir do método de quantificação relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de PCR foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por trinta segundos (elongamento). Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados (Δ Ct) com base nos valores de Ct obtidos para o gene de controle endógeno (18 S). O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi desenvolvido de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por Livak and Schmittgen (2001).

Extração de DNA, qPCR e quantificação bacteriana

A extração do DNA total das amostras de ceco e íleo foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Stevenson and Weimer, 2007 com algumas modificações. Amostras de conteúdo do íleo (2 g) e colon (1,5 g) foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas (10.000 x g/10min/4°C) e o

sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspendido, em 3 ml de tampão de extração, homogeneizado e 1 ml do conteúdo foi retirado e submetido a lise mecânica no Bead bater (Bartlesville, Oklahoma, EUA). Em seguida, o DNA foi purificado e quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). A qualidade e a integridade do DNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 0,8%. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

A análise de qPCR para *Lactobacillus* spp., Enterobacteriaceae e bactérias totais foi realizada como descrito por de Li et al. (2009), com algumas modificações. A quantificação do número de cópias de DNA para cada grupo bacteriano foi realizada com Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando como detecção o sistema SYBR Green Master Mix (Fast SYBR® green master mix; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada diluição padrão e das amostras foram feitas em duplicata com volume de 10 µL de reação, contendo 5 µL Fast SYBR, 1 µL de cada primer (10 µM) (Tabela 2), 2,2 µL de água ultrapura e 0,8 µL (10 ng) de DNA. A reação de amplificação foi realizada a 95°C por 10 min para desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 1 min a 60°C para anelamento e 72°C por 30 s para extensão. Para determinar a especificidade da amplificação, uma curva de fusão dos produtos de PCR foi monitorada por aquecimento lento com um incremento de 0,1°C de 60 a 95°C, com detecção de fluorescência em intervalos de 0 a 1°C.

A curva padrão foi construída a partir de amplicons de 16S rRNA de culturas puras de *E. coli*, para quantificação de enterobactérias e bactéria total e culturas puras de *L. delbrueckii* para a quantificação do gênero lactobacilos. Os amplicons foram obtidos utilizando os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TA-CGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Para a construção da curva, diluições seriadas de dez vezes foram adotadas,

com concentração de 16S rRNA variando de $6,23 \times 10^9$ – $6,23 \times 10^4$ cópias. μl^{-1} , para todos os grupos bacterianos. A concentração do número de moléculas de 16S rRNA dos produtos de PCR foi mensurada pelo Qubit® Fluorometer (ThermoFisher, MA, EUA) e o número de cópias foi convertido pela equação:

$$= \frac{[(6,02 \times 10^{23})(\text{moléculas/mol}) \times \text{quantidade de Dna (g)}]}{(\text{tamanho do fragmento (pb)} \times 660 (\text{g/mol/pb}))}$$

Com os valores médios de Ct (Cycle threshold) versus o log do número de cópias de DNA de cada diluição, a curva padrão foi determinada. O número de cópias do total de bactérias de cada grupo/tratamento, em 10 ng de DNA, foi determinado por interpolação entre os valores de CT médio das amostras com as curvas padrões. As eficiências de qPCR foram calculadas por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})-1}$. A eficiência de qPCR variou entre 85 e 105%. Os dados foram analisados usando a sequência de software Sistema de Detecção de ABI.

Análise estatística

Para as variáveis de desempenho, a baía foi considerada a unidade experimental, enquanto que para as variáveis de saúde intestinal, o animal abatido aos 35 d foi utilizado como unidade experimental.

Os dados foram analisados pela ANOVA do software R (<https://cran.r-project.org/>), de acordo com o seguinte modelo geral:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

onde Y_{ij} é a variável dependente medida, μ é a média geral, τ_i é o efeito do tratamento i e β_j é o efeito de bloco j e ε_{ij} é o erro aleatório.

A significância foi definida como $P < 0,05$. A comparação das médias, quando necessária, foi feita pelo teste Tukey.

4. RESULTADOS

Desempenho, escore fecal e pH intestinal

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) de NUC e ATB sobre o CRD, GPD, CA e peso médio aos 35 dias (Tabela 3). A inclusão de NUC e ATB também não alterou o escore fecal e o pH intestinal (dados não apresentados).

Morfometria intestinal

No duodeno, a suplementação de NUC e ATB tiveram efeito semelhante e, aumentaram a altura de vilosidades ($P < 0,05$) em relação ao tratamento CON (Tabela 4). Já na porção do jejuno, NUC apresentou maior altura de vilosidade ($P < 0,05$) em relação ao CON e ATB, que não diferiram entre si. Maior profundidade de cripta também foi constatada para animais suplementados com NUC e ATB ($P < 0,05$). Não houve efeito de tratamento na altura e profundidade de cripta do íleo e na relação vilo:cripta de nenhum segmento ($P > 0,05$). Além disso, o uso de NUC e ATB reduziu a área celular das células de Paneth ($P < 0,05$) em relação ao tratamento CON (Figura 3).

Contagem de células em proliferação ou apoptose e linfócitos B

Animais suplementados com NUC e ATB apresentaram maior número de células em proliferação (células positivas para Ki) do que nos animais CON no duodeno ($P < 0,05$; Figura 4), enquanto que a suplementação de ATB aumentou o número de células positivas para Ki no jejuno ($P < 0,05$) quando comparado ao CON e NUC, que não diferiram entre si ($P < 0,05$). Não houve diferença no número de marcações na porção do íleo entre os tratamentos ($P > 0,05$).

O número de marcações de apoptose celular (células positivas para Cpp-3), na região duodenal, não foi afetado pelos tratamentos ($P > 0,05$; Figura 5). A

inclusão de NUC aumentou a contagem de células positivas para Cpp-3 na porção do jejuno ($P < 0,05$) em relação aos grupos CON e ATB, que não diferenciaram entre si ($P > 0,05$). No íleo, houve redução do número de marcações para Cpp-3 nos animais suplementados com ATB em relação aos animais que receberam NUC ($P < 0,05$), mas foi similar ao tratamento CON ($P > 0,05$).

Na contagem de marcação de células B, NUC e ATB reduziram a contagem de marcações no duodeno e íleo ($P < 0,05$; Figura 6), entretanto, aumentaram o número de células B no segmento de jejuno ($P < 0,05$), em comparação ao tratamento CON.

Abundância relativa de mRNA intestinal

A abundância relativa de mRNA para os genes de MAPK-6, Hp e TNF- α não foi influenciada pelos tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 5).

Quantificação microbiana

No íleo, animais suplementados com ATB apresentaram menor número de cópias de bactéria total (BT) ($P < 0,05$), enquanto que a suplementação com NUC apresentou contagem bacteriana total semelhante ao grupo CON (Tabela 6). Já na porção do cólon, os tratamentos com a adição de NUC e ATB tiveram diminuição de BT ($P < 0,05$) em comparação ao CON. Para o grupo lactobacilos, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) em ambos os segmentos. Por fim, o número de cópias de enterobactérias no íleo foi superior ($P < 0,05$) para os animais alimentados com NUC, sem efeitos ($P > 0,05$) no cólon.

5. DISCUSSÃO

Nossa hipótese era de que a suplementação dietética de nucleotídeos seria uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento para leitões recém desmamados. Portanto, a compreensão dos efeitos da suplementação de nucleotídeos na fisiologia é importante para prevenir infecções, especialmente em animais mantidos em alta densidade e alimentados com ingredientes que contêm consideravelmente menores concentrações de nucleotídeos com milho, farelo de soja e o plasma sanguíneo (9, 38 e 7 mg/kg de nucleotídeos livres, respectivamente) (Mateo et al., 2004).

Entretanto, nesse trabalho não foi observado efeito da suplementação de nucleotídeos purificados no desempenho dos leitões em relação as dietas de controle, embora o GDP e CA tenham aumentado em mais de 10% em relação ao controle. A ausência de resultados significativos no desempenho de suínos tem sido relatada em vários estudos (Plante et al., 2011; Amorim et al., 2017; Waititu et al., 2017).

Há ainda inconsistência sobre o efeito dos nucleotídeos nos parâmetros de crescimento. Os aditivos podem ter suas ações influenciadas por diversos fatores, como saúde dos animais, a digestibilidade dos ingredientes da ração, manejo, o modelo animal utilizado, idade, estirpe e tipo de desafio, como também a fonte de suplementação do aditivo (Liu et al., 2018). Alguns trabalhos conduzidos com nucleotídeos derivado de levedura observaram maior desempenho nos leitões suplementados (Superchi et al., 2012; Waititu et al., 2015, 2016). Todavia, essa fonte de nucleotídeos possuem em sua constituição células viáveis, componentes de parede de celular, inositol, aminoácidos funcionais (Doo et al., 2019); e portando torna difícil à atribuição de efeitos biológicos relativos especificamente aos nucleotídeos.

Assim, o mecanismo pelo qual os nucleotídeos melhoram as respostas de desempenho em leitões ainda não é clara. Entretanto, há a hipótese de que eles melhoram o desenvolvimento da mucosa intestinal, devido a sua participação na formação das moléculas de DNA, RNA e ATP, necessários ao processo de divisão celular (Sauer et al., 2011). Nossos resultados mostraram que a adição de NUC aumentou a proliferação celular e altura das vilosidades, de forma similar ao ATB no duodeno dos leitões aos 35 dias de idade. Essa melhora no desenvolvimento da mucosa pode ser explicada pela maior disponibilidade de material genômico, como os nucleosídeos, nos reservatórios celulares para o crescimento rápido (Carver, 1994). Isso demonstra que a suplementação de nucleotídeos é importante para enterócitos, que possuem alta taxa de multiplicação, baixo nível de síntese de novo (Cosgrove, 1998), e cuja maturação e altura de vilosidade são indicadores da capacidade digestiva e absorviva do animal. Assim, ao aumentar o crescimento celular da mucosa intestinal reduz-se o estresse que os animais podem sofrer no pós-desmame.

O efeito dos nucleotídeos sobre a mucosa também pôde ser observado pela maior contagem de morte celular no jejuno dos leitões suplementados com NUC em relação aos grupos com CON e ATB. Godlewski et al. (2009) e Amorim et al. (2017), também relataram efeito da suplementação de nucleotídeos na mucosa intestinal aumentando o número de células em processo de autofagia e reduzindo a relação mitose:apoptose em relação ao grupo controle, respectivamente, o que comprovaria um processo de remodelagem da mucosa no grupo suplementado muito mais rápido para a manutenção da integridade intestinal.

Os primeiros 14 dias após o desmame são frequentemente acompanhados pelo aumento da ativação do sistema imune, o qual é intensificado em situações de desafio imune aos animais. Isso pode ser demonstrado pela produção de citocinas,

moléculas fundamentais na modulação da resposta inflamatória no trato gastrointestinal (Hu et al., 2013) e que estas podem permanecer elevadas e detectadas com até 14 dias após o desmame (Rochell et al., 2015). Entretanto, no presente estudo, não houve modificação na abundância relativa de mRNA de marcadores de inflamação pelos NUC e ATB, diferentemente do efeito foi relatado por Superchi et al. (2012), Waititu et al. (2017). Tem sido sugerido que o pico de produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e de TNF- α , ocorre no primeiro dia após o desmame, retornando ao nível basal aproximadamente cinco dias após o desmame (Pié et al., 2004), o que justificaria a não detecção de alterações significativas.

Por outro lado, o efeito da suplementação de nucleotídeos sobre o sistema imunológico, semelhante ao antibiótico, foi observado pelo aumento da proliferação de linfócitos B no segmento de jejuno. Efeito semelhante de proliferação de linfócitos foi observado Giancamillo et al. (2016) no processo de mitose de folículos linfáticos. Em contra partida, houve redução do número de linfócitos presentes no íleo. Nós acreditamos que os animais suplementados com nucleotídeos, de forma similar aos animais suplementados com antibiótico, apresentaram melhor adaptação ao ambiente, a microbiota residente e aceleraram os processos de maturação do sistema imune para combate aos patógenos. Isso pôde ser comprovado pela redução na área celular das células de Paneth, importantes na produção de defensinas, responsáveis pela ativação de respostas antimicrobianas em outros tipos de células (Medzhitov, 2007), como macrófagos e os linfócitos. Estes resultados sugerem que a ação dos nucleotídeos nas respostas imunes humorais pode se dar nas respostas imunes locais, próximo ao local da inflamação (mucosa intestinal), potencializando, quando necessárias, as respostas imunitárias humorais.

A microbiota intestinal desempenha papéis importantes na saúde e no bem-estar animal (Guevarra et al., 2019). Assim, o estabelecimento e manutenção de uma microbiota intestinal benéfica no início da vida dos leitões é crucial para um bom desempenho e saúde ao longo do ciclo produtivo. Em nosso estudo, a adição de nucleotídeos não modificou a contagem de lactobacilos. Um dos motivos que tem sido sugerido é de que as bactérias ácido lácticas não são dependentes de nucleotídeos para aumentar a sua proliferação e colonização (Terrade and Mira de Orduña, 2009) e sim por outros substratos, como a glicose, (Kilstrup et al., 2005) presentes no ambiente intestinal. Em contra partida, os NUC aumentaram a contagem microbiana ileal. Esse aumento pode estar relacionado ao aumento na biodiversidade microbiana (Andrés-Elias et al., 2007), como também pela abundância de enterobactérias detectada. De acordo Sauer et al. (2010) a suplementação de nucleotídeos pode propiciar um microambiente adequado ao crescimento de cepas de E.coli não patogênica e redução de cepa patogênica. Esse efeito positivo na modulação da microbiota pôde ser observado em nosso trabalho pela redução do número de linfócitos B marcados e pela redução da área celular das células de Paneth na região ileal. No cólon, a suplementação de NUC foi significativa para a redução da contagem bacteriana total. Isso pode estar relacionado a diminuição na quantidade de substrato fermentativo pelo maior desenvolvimento da mucosa nos animais suplementados com nucleotídeos e antibiótico. Com esses resultados, nós podemos sugerir que a suplementação de nucleotídeos modula a microbiota intestinal com microrganismos benéficos aos animais.

6. CONCLUSÃO

A suplementação de nucleotídeos purificados para leitões desmamados melhora a saúde intestinal, pela modulação da resposta imune local e desenvolvimento da mucosa intestinal e, portanto, pode ser uma alternativa aos antibióticos como promotores de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Projeto nº 001) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A apreciação é estendida à Technofeed LTDA (Vinhedo, São Paulo, Brasil) pela doação do Ascogen® e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, (<http://www.nmm.ufv.br/>) pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

Conflict of interest statement

This work has no conflict of interest.

Ethics statement

This experiment is in accordance with Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV).

Software and data repository resources

None of the data were deposited in an official repository.

Referências

- Ambrosio CMS, de Alencar SM, de Sousa RLM, Moreno AM and Da Gloria EM 2017. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Ind Crops Prod* 97, 128–136.
- Amorim AB, Berto DA, Saleh MAD, Miassi GM and Ducatti C 2017. Dietary glutamine, glutamic acid and nucleotides increase the carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) on the intestinal mucosa of weaned piglets. *animal* 11, 1472–1481.
- Andrade C De, Almeida VV de, Sbardella M, Perina DDP, Silva FDL, Berenchein B, Costa LB, Miyada VS and Miyada VS 2016. Performance and intestinal health of weanling pigs fed with dietary nucleotides. *Semin-Cienc Agrar* 37, 2181.
- Andrés-Elias N, Pujols J, Badiola I and Torrallardona D 2007. Effect of nucleotides and carob pulp on gut health and performance of weanling piglets. *Livest Sci* 108, 280–283.
- Angelakis E, Merhej V and Raoult D 2013. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infect Dis* 13, 889–899.
- Buret AG 2010. Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin. *Can J Vet Res* 74, 1–10.
- Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA and Hunter N 2004. Quantitative Analysis of Diverse Lactobacillus Species Present in Advanced Dental Caries. *J Clin Microbiol* 42, 3128–3136.
- Carver JD 1994. Dietary Nucleotides: Cellular Immune, Intestinal and Hepatic System Effects. *J Nutr* 124, 144S-148S.
- Castillo M, Martinorue S, ManzanillaA E, Badiola I, Martin M and Gasa J 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet Microbiol* 114, 165–170.
- Che L, Hu L, Liu Y, Yan C, Peng X, Xu Q, Wang R, Cheng Y, Chen H, Fang Z, Lin Y, Xu S, Feng B, Chen D and Wu D 2016. Dietary Nucleotides Supplementation Improves the Intestinal Development and Immune Function of Neonates with Intra-Uterine Growth Restriction in a Pig Model. *PLOS ONE* 11, e0157314.
- Cosgrove M 1998. Nucleotides. *Nutrition* 14, 748–751.
- Daneshmand A, Kermanshahi H, Danesh Mesgaran M, King AJ and Ibrahim SA 2017. Effects of pyrimidine nucleosides on growth performance, gut morphology, digestive enzymes, serum biochemical indices and immune response in broiler chickens. *Livest Sci* 204, 1–6.
- Domenechini, C.; Di Giancamillo, A.; Arrighi, S.; Bosi G 2006. *Histol Histopathol* 21, 273–283.
- Domenechini C, Di Giancamillo A, Savoini G, Paratte R, Bontempo V and Dell'Orto V 2004. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. *Histol Histopathol* 19, 49–58.
- Doo E-H, Schwab C, Chassard C and Lacroix C 2019. Cumulative effect of yeast extract and fructooligosaccharide supplementation on composition and metabolic activity of elderly colonic microbiota in vitro. *J Func Foods* 52, 43–53.
- Ekwanzala MD, Dewar JB, Kamika I and Momba MNB 2018. Systematic review in

- South Africa reveals antibiotic resistance genes shared between clinical and environmental settings. *Infect Drug Resist* 11, 1907–1920.
- Le Floc'h N, Jondreville C, Matte JJ and Seve B 2006. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Arch Anim Nutr* 60, 23–34.
- Giancamillo A Di, Domeneghini C, Paratte R, Dell'orto V and Bontempo V 2016. Oral feeding with L-Glutamine and Nucleotides: impact on some GALT (gut associated lymphoid tissue) parameters and cell proliferation/death rates in weaning piglets. *Ital J Anim Sci* 2, 364–366.
- Godlewski MM, Bierała JB, Strzałkowski A, Martinez-Puig D, Pająk B, Kotunia A, Chetrit C and Zabielski R 2009. A novel cytometric approach to study intestinal mucosa rebuilding in weaned pigs fed with dietary nucleotides. *Livest Sci* 123, 215–220.
- Gonçalves WG, Fernandes KM, Barcellos MS, Silva FP, Magalhães-Junior MJ, Zanuncio JC, Martins GF and Serrão JE 2014. Ultrastructure and Immunofluorescence of the midgut of *Bombus morio* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). *C R Biol* 337, 365–372.
- Guevarra RB, Lee JH, Lee SH, Seok M-J, Kim DW, Kang BN, Johnson TJ, Isaacson RE and Kim HB 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *J Anim Sci Biotechnol* 10, 1.
- Hu CH, Xiao K, Luan ZS and Song J 2013. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs¹. *J Anim Sci* 91, 1094–1101.
- Jiao Y and Kim IH 2019b. Effects of nucleotide supplementation on growth performance, nutrient digestibility, and immune blood profiles related to foot-and-mouth disease in vaccinated growing pigs. *Can J Anim Sci* 99, 326–331.
- Kilstrup M, Hammer K, Jensen PR and Martinussen J Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Immunol* 29, 555-590.
- Lee DN, Liu SR, Chen YT, Wang RC, Lin SY and Weng CF 2007. Effects of diets supplemented with organic acids and nucleotides on growth, immune responses and digestive tract development in weaned pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 91, 508–518.
- Li M, Penner GB, Hernandez-Sanabria E, Oba M and Guan LL 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J Appl Microbiol* 107, 1924–1934.
- Liu Y, Espinosa CD, Abelilla JJ, Casas GA, Lagos LV, Lee SA, Kwon WB, Mathai JK, Navarro DMDL, Jaworski NW and Stein HH 2018. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Anim Nutr* 4, 113–125.
- Liu Y, Yang X, Xin H, Chen S, Yang C, Duan Y and Yang X 2017. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. *Anim Sci J* 88, 1414–1424.
- Livak KJ and Schmittgen TD 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Martinez-Puig D, Manzanilla EG, Morales J, Borda E, Pérez JF, Piñeiro C and Chetrit C 2007. Dietary nucleotide supplementation reduces occurrence of diarrhoea in early weaned pigs. *Livest Sci* 108, 276–279.
- Martínez JL 2017. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical

- selection process. *F1000 Research* 6, 51.
- Mateo CD, Dave RI and Stein HH Effects of supplemental nucleosides for newly weaned pigs. *J Anim Sci*, 82 (suppl 2) 71 (Abstract).
- Medzhitov R 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.
- Pfaffl MW 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B and Oswald IP 2004. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. *J Nutr* 134, 641–647.
- Plante PA, Laforest J-P and Farmer C 2011. Effect of supplementing the diet of lactating sows with NuPro on sow lactation performance and piglet growth. *Can J Anim Sci* 91, 295–300.
- Rochell SJ, Alexander LS, Rocha GC, Van Alstine WG, Boyd RD, Pettigrew JE and Dilger RN 2015. Effects of dietary soybean meal concentration on growth and immune response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus1. *J Anim Sci* 93, 2987–2997.
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F. M.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides RF 2011. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements. Universidade Federal de Viçosa Departamento de Zootecnia, Viçosa Brazil.
- Salobir J, Rezar V, Pajk T and Levart A 2005. Effect of nucleotide supplementation on lymphocyte DNA damage induced by dietary oxidative stress in pigs. *Anim Sci* 81, 135–140.
- Sauer N, Bauer E, Vahjen W, Zentek J and Mosenthin R 2010. Nucleotides modify growth of selected intestinal bacteria in vitro. *Livest Sci* 133, 161–163.
- Sauer N, Mosenthin R and Bauer E 2011. The role of dietary nucleotides in single-stomached animals. *Nutr Res Rev* 24, 46–59.
- Sauer N, Eklund M, Bauer E, Gänzle MG, Field CJ, Zijlstra RT and Mosenthin R 2012a. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs1. *J Anim Sci* 90, 3126–3134.
- Sauer N, Eklund M, Roth S, Rink F, Jezierny D, Bauer E and Mosenthin R 2012b. Short-term effect of dietary yeast nucleotide supplementation on small intestinal enzyme activities, bacterial populations and metabolites and ileal nutrient digestibilities in newly weaned pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96, 700–708.
- Stein HH and Kil DY 2006. Reduced Use of Antibiotic Growth Promoters in Diets Fed to Weanling Pigs: Dietary Tools, Part 2. *Anim Biotechnol* 17, 217–231.
- Stevenson DM and Weimer PJ 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 165–174.
- Superchi P, Saleri R, Borghetti P, De Angelis E, Ferrari L, Cavalli V, Amicucci P, Ossiprandi MC and Sabbioni A 2012. Effects of dietary nucleotide supplementation on growth performance and hormonal and immune responses of piglets. *Animal* 6, 902–908.
- Takahashi H, Saito R, Miya S, Tanaka Y, Miyamura N, Kuda T and Kimura B 2017. Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of Enterobacteriaceae. *Int J Food Microbiol* 246, 92–97.
- Terrade N and Mira de Orduña R 2009. Determination of the essential nutrient

- requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int J Food Microbiol* 133, 8–13.
- Waititu SM, Heo JM, Patterson R and Nyachoti CM 2015. Dose-response effects of in-feed antibiotics on growth performance and nutrient utilization in weaned pigs fed diets supplemented with yeast-based nucleotides. *Anim Nutr* 1, 166–169.
- Waititu SM, Heo JM, Patterson R and Nyachoti CM 2016. Dietary yeast-based nucleotides as an alternative to in-feed antibiotics in promoting growth performance and nutrient utilization in weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 96, 289–293.
- Waititu SM, Yin F, Patterson R, Yitbarek A, Rodriguez-Lecompte JC and Nyachoti CM 2017a. Dietary supplementation with a nucleotide-rich yeast extract modulates gut immune response and microflora in weaned pigs in response to a sanitary challenge. *animal* 11, 2156–2164.
- Waititu SM, Yin F, Patterson R, Yitbarek A, Rodriguez-Lecompte JC and Nyachoti CM 2017b. *A. animal* 11, 2156–2164.
- Yang KM, Jiang ZY, Zheng CT, Wang L and Yang XF 2014. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K881. *J Anim Sci* 92, 1496–1503.
- Yu M, Zhang C, Yang Y, Mu C, Su Y, Yu K and Zhu W 2017. Long-term effects of early antibiotic intervention on blood parameters, apparent nutrient digestibility, and fecal microbial fermentation profile in pigs with different dietary protein levels. *J Anim Sci Biotechnol* 8, 60.
- Zhao J, Zhang X, Liu H, Brown MA and Qiao S 2018. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. *Curr Protein Pept Sci* 20, 145–154.

Tabela 1 Lista de iniciadores utilizados na análise de expressão gênica relativa tecidual por RT-qPCR

Alvo	Número GenBank	Sequência do Primer*
MAPK-6	XM_021095339.1	F: GGAGCTTCTCAGCGTAATTC R: CAGGAAATCCAGTGCTTCTC
Hp	NM_214022.1	F: GCTAAGAATCTCCGCTTGG R: CAATCTCCACCTCCTGTTTC
TNF- α	NM_214022.1	F: CATCGCCGTCTCCTACCA R: CCCAGATTCAGCAAAGTCCA
18 S	AY_265350.1	F: GGCTACCACATCCAAGGAAG R: TCCAATGGATCCTCGCGGAA

* F e R indicam os primers Forward e Reverse, respectivamente.

ICAM-1: Molécula de adesão intracelular 1; MAPK-6: Proteína quinase ativada por mitógeno; Hp: haptoglobina; TNF- α : Fator necrose tumoral alfa

Tabela 2 Lista de iniciadores utilizados na quantificação bacteriana por análise de qPCR (sequências de 16S rDNA)

Bactéria alvo (grupo)	Sequência do Primer*	Referência
Lactobacillus spp.	F: TGGAAACAGRTGCTAATACCG R: GTCCATTGTGGAAGATTCCC	Byun et al., 2004
Enterobacteria spp.	F: ATG TTA CAA CCA AAG CGT ACA R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	(Takahashi et al., 2017)
Bacteria total	F: GCAGGCCTAACACATGCAAGTC R: CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Castillo et al., 2008

* F e R indicam os primers Forward e Reverse, respectivamente.

Tabela 3 Efeito de nucleotídeos e antibiótico no desempenho de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.

Variável	Tratamentos			SEM	P-valor
	CON ¹	NUC ²	ATB ³		
Peso médio inicial, kg	7.46	7.46	7.43	0.24	-
Consumo de ração, kg/dia	0.294	0.300	0.316	0.009	0.28
Ganho de peso, kg/dia	0.195	0.218	0.225	0.012	0.44
Conversão alimentar	1.61	1.44	1.44	0.13	0.59
Peso médio aos 35 dias, kg	10.20	10.51	10.59	0.42	0.60

¹CON = controle; ²NUC = nucleotídeos; ³ATB = antibiótico.

Tabela 4 Efeito de nucleotídeos e antibiótico na morfometria intestinal (duodeno, jejuno e íleo) de leitões 14 dias pós-desmame.

Segmento	Tratamentos			SEM	P-valor
	CON ¹	NUC ²	ATB ³		
Duodeno					
Altura de Vilosidade, μm	176.07 ^b	211.48 ^a	218.13 ^a	24.3	0.03
Profundidade de cripta, μm	152.76	160.60	152.14	18.9	0.69
Relação vilo:cripta	1.29	1.45	1.53	0.23	0.12
Jejuno					
Altura de Vilosidade, μm	198.20 ^b	253.14 ^a	204.08 ^b	20.6	<0.001
Profundidade de cripta, μm	137.27 ^b	151.03 ^a	152.38 ^a	13.9	0.05
Relação vilo:cripta	1.57	1.71	1.44	0.24	0.29
Íleo					
Altura de Vilosidade, μm	154.90	171.59	170.12	22.7	0.58
Profundidade de cripta, μm	113.85	119.48	117.34	12.8	0.83
Relação vilo:cripta	1.44	1.49	1.74	0.21	0.14

^{a,b} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

¹CON = controle; ²NUC = nucleotídeos; ³ATB = antibiótico.

Tabela 5 Abundância relativa de mRNA de marcadores inflamatórios no jejuno de leitões 14 dias pós-desmame.

Gene alvo	Tratamentos			SEM	P-valor
	CON ¹	NUC ²	ATB ³		
MAPK-6	1.54	1.01	1.28	0.22	0.34
TNF- α	1.91	2.01	2.42	0.27	0.43
Haptoglobina	4.22	3.61	3.77	0.47	0.69

¹CON = controle; ²NUC = nucleotídeos; ³ATB = antibiótico.

Tabela 6 Efeito de nucleotídeos e antibiótico na microbiota intestinal (em log₁₀ 16S rDNA número de cópias/g) de leitões 14 dias pós-desmame.

Grupos/Segmento	Tratamentos			SEM	P-valor
	CON ¹	NUC ²	ATB ³		
Íleo					
Bacteria total	5.24 ^a	5.39 ^a	4.57 ^b	0.24	<0.001
Lactobacillus spp.	6.04	6.02	5.64	0.23	0.50
Enterobacteriaceae	5.43 ^b	6.11 ^a	5.11 ^b	0.23	<0.001
Cólon					
Bacteria total	6.07 ^a	5.78 ^b	5.80 ^b	0.08	0.04
Lactobacillus spp.	5.81	5.90	5.52	0.17	0.29
Enterobacteriaceae	7.52	7.26	6.43	0.29	0.17

^{a,b} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

¹CON = controle; ²NUC = nucleotídeos; ³ATB = antibiótico.

Figure captions

Figura 1 - Imagem representativa dos cortes histológicos para mensuração da altura de vilosidade e profundidade de cripta. A: duodeno. B: jejuno. C: íleo. Os cortes foram corados em azul de toluidina. Ampliação da lente 40x.

Figura 2 - Imagem confocal representativa mostrando o reconhecimento de células com base na intensidade de fluorescência dos anticorpos. A: marcações anti-CD em verde. B: marcações anti-ki67 em vermelho e anti-cpp32 em verde. Os núcleos das células foram marcados com DAPI. Ampliação da lente 20x.

Figura 3 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na área celular (células de Paneth) de leitões 14 dias pós desmame.

Figura 4 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de células positivas para Ki de leitões 14 dias pós desmame.

Figura 5 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de células positivas para Cpp-3 de leitões 14 dias pós desmame.

Figura 6 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de células B de leitões 14 dias pós desmame.

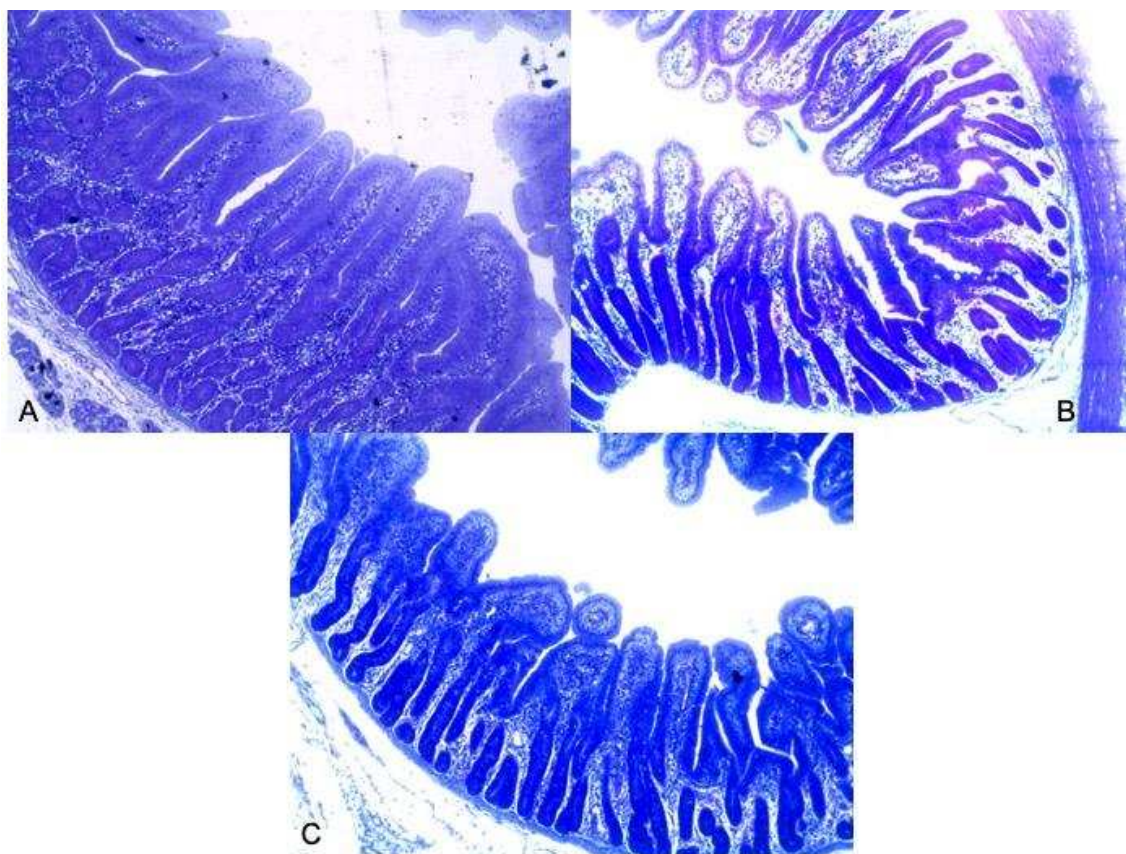


Figura 1 - Imagem representativa dos cortes histológicos para mensuração da altura de vilosidade e profundidade de cripta. A: duodeno. B: jejuno. C: íleo. Os cortes foram corados em azul de toluidina. Ampliação da lente 40x.

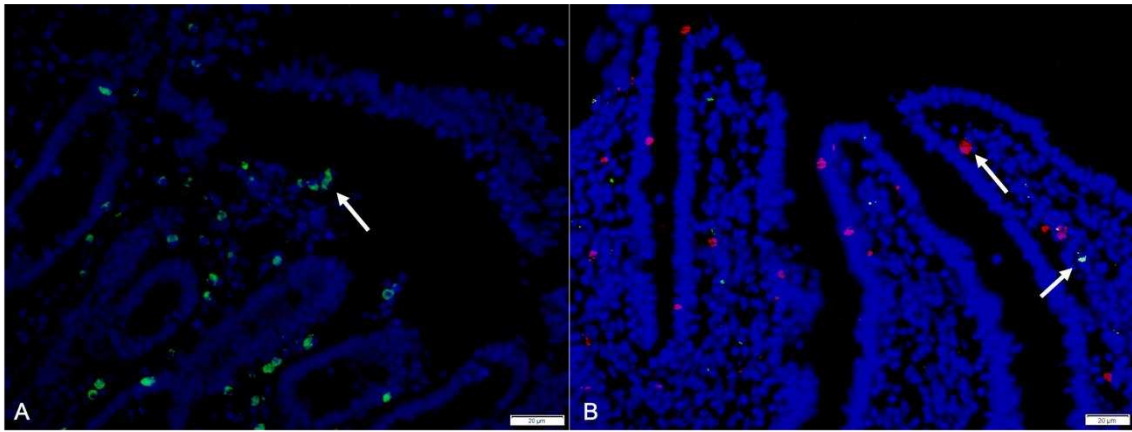


Figura 2 - Imagem confocal representativa mostrando o reconhecimento de células com base na intensidade de fluorescência dos anticorpos. A: marcações anti-CD em verde. B: marcações anti-ki67 em vermelho e anti-cpp32 em verde. Os núcleos das células foram marcados com DAPI. Ampliação da lente 20x.

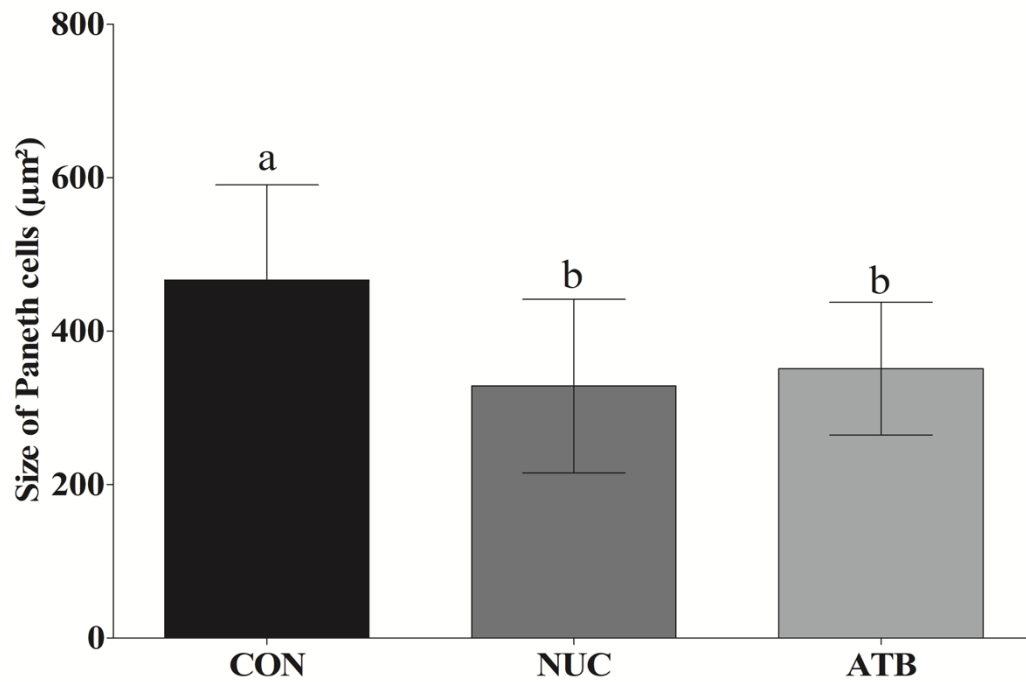


Figura 3 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na área celular (células de Paneth) de leitões 14 dias pós desmame;

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CON = controle; NUC = nucleotídeos; ATB = antibiótico.

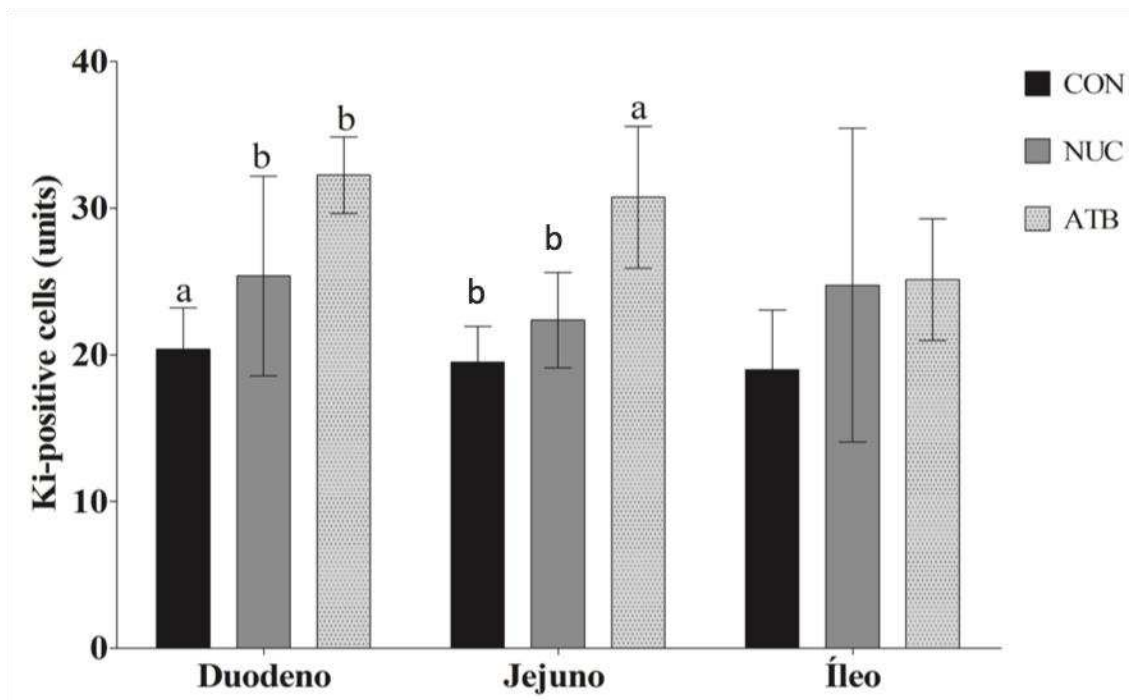


Figura 4 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de células positivas para Ki de leitões 14 dias pós desmame.

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CON = controle; NUC = nucleotídeos; ATB = antibiótico.

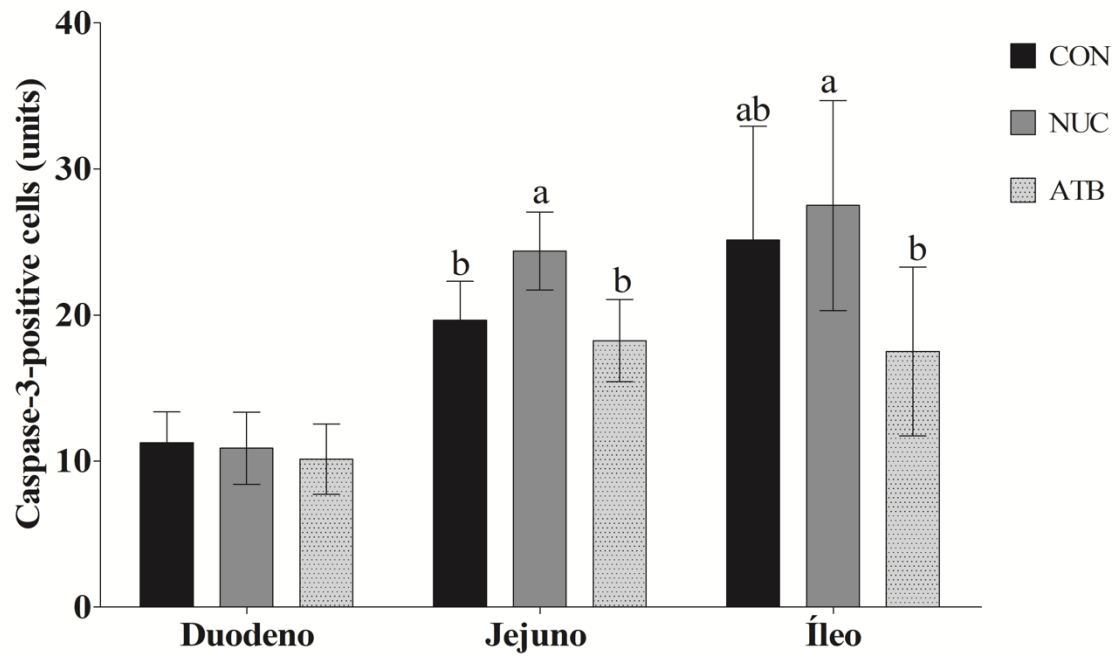


Figura 5 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de células positivas para Cpp-3 de leitões 14 dias pós desmame.

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CON = controle; NUC = nucleotídeos; ATB = antibiótico.

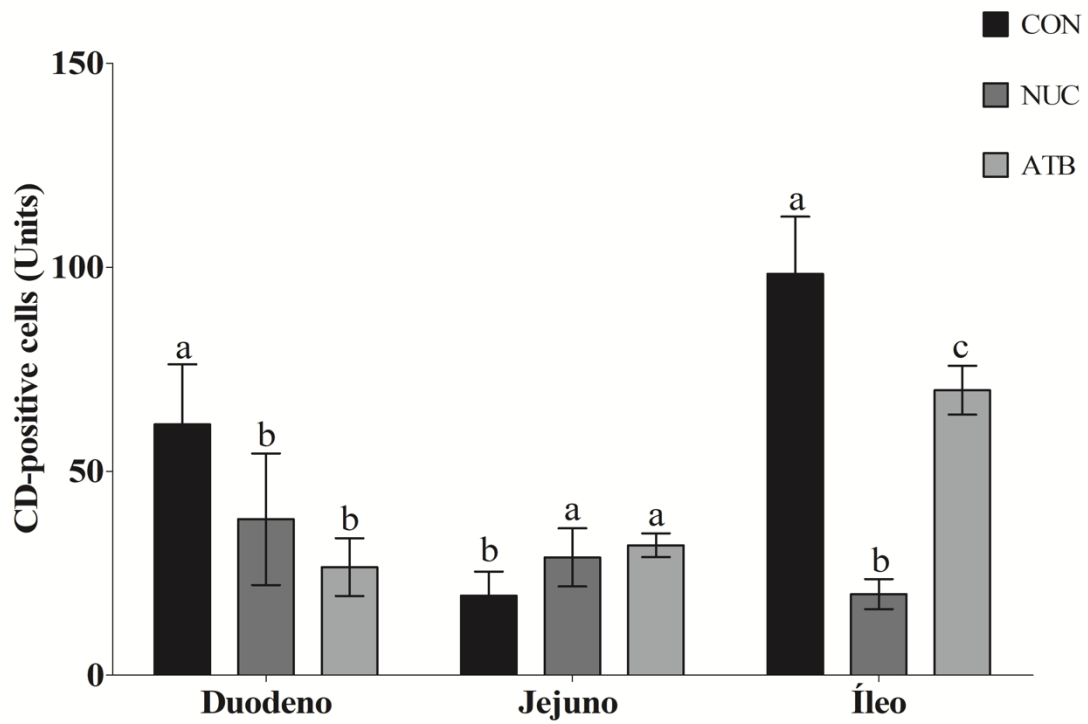


Figura 6 - Efeito de nucleotídeos e antibiótico na contagem de células B de leitões 14 dias pós desmame.

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CON = controle; NUC = nucleotídeos; ATB = antibiótico.

Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 08 de Dez. de 2017

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Nucleotídeos como alternativa aos antibióticos como promotores de crescimento em dietas para leitões**", protocolo nº **053/2017**, sob a responsabilidade de **Gabriel Cipriano Rocha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **17 de Nov. de 2017**.

Finalidade: **Pesquisa** **Ensino**

Vigência do Projeto: de **08 de Dez. de 2017** a **31 de Mar. de 2018**

Espécie/linhagem: **Suíno (Sus domesticus)** Nº de animais: **128**

Peso: **6 Kg** Idade: **21 dias** Sexo: "**-----**" Origem: **Setor de Suínocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Nucleotides as an alternative to in-feed antibiotics for piglets**", protocol nº **053/2017**, under the responsibility of **Gabriel Cipriano Rocha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Nov, 17th, 2017**.

Finality: **Research** **Education**

Duration of the Project: from **Dec, 08th, 2017** to **Mar, 31th, 2018**.

Species / strain: **Swine (Sus domesticus)** Nº of animals: **128**

Weight: **6 Kg** Age: **21 days** Sex: "**-----**" Source: **Setor de Suínocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

Luciana Navajas Rennó
Coordenadora da CEUAP/UFV

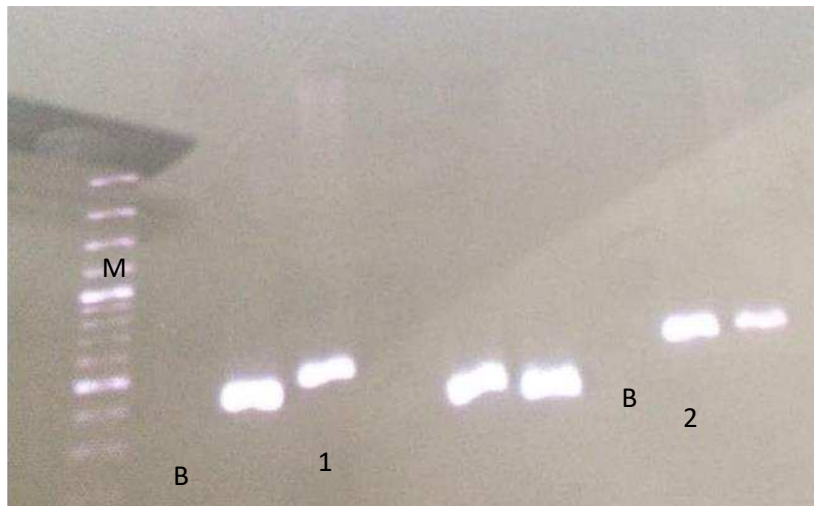


Figura 1 - Gel de agarose (0.8%) indicando os produtos de PCR não específicos dos primers (Castillo et al., 2008) utilizados na literatura na quantificação microbiana M: marcador; B: Branco; 1: amplificação de E.coli com primer para lactobacilos; 2: Amplificação de L. delbruickii com primer para enterobactéria. Os produtos foram separados a 80 V por 2 horas.

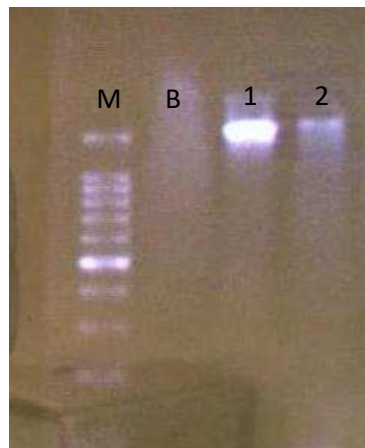


Figura 2 - Gel de agarose (0.8%) indicando os produtos de PCR (16S) específicos (Takahashi et al., 2017) utilizado na quantificação de enterobactérias M: marcador; B: Branco; 1: amplificação de E.coli com primer para enterobactérias; 2: não amplificação de L. delbruickii com primer para enterobactérias Os produtos foram separados a 80 V por 2 horas.

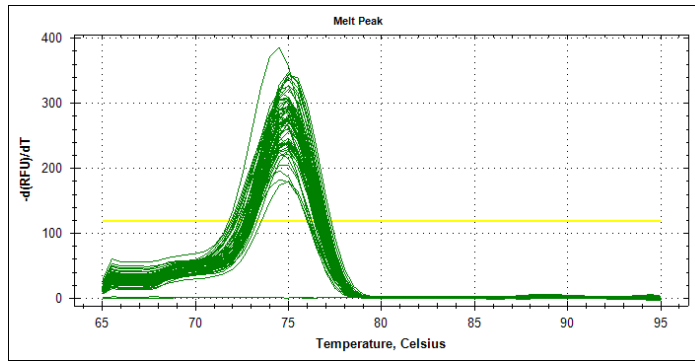


Figura 3 - Curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR para o primer Haptoglobina

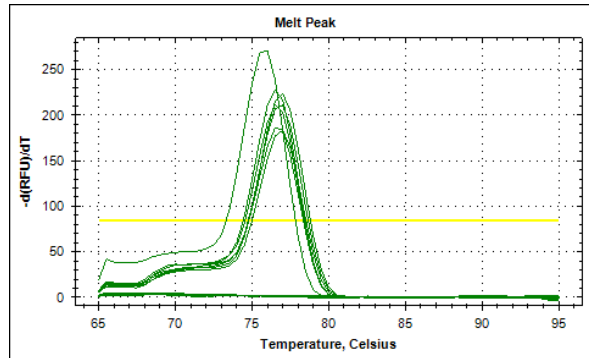


Figura 4 - Curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR para o primer MAPK

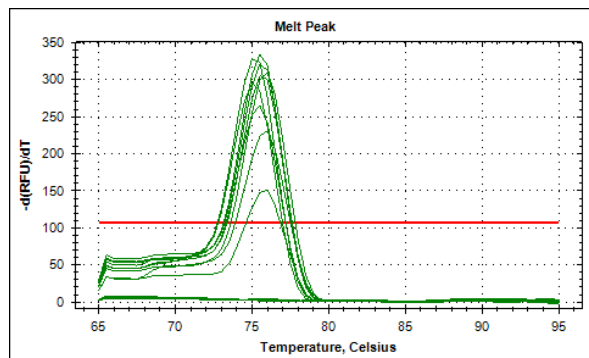


Figura 5 - Curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR para o primer TNF- α