

MAYKELLY DA SILVA GOMES

**EFEITO DE PROBIÓTICOS E ÓXIDO DE ZINCO NA SAÚDE E MORFOLOGIA
INTESTINAL DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE**

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: Alysson Saraiva
Marcio de Souza Duarte

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633p
2021
Gomes, Maykelly da Silva, 1995-
Efeito de probióticos e óxido de zinco na saúde e
morfologia intestinal de leitões em fase de creche [recurso
eletrônico] / Maykelly da Silva Gomes. – Viçosa, MG, 2021.
29 f.: il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Gabriel Cipriano Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.16-21.

Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/>

1. Suínos - Alimentação e rações. 2. Probióticos. 3. Óxido
de zinco. 4. Intestinos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.40855

MAYKELLY DA SILVA GOMES

**EFEITO DE PROBIÓTICOS E ÓXIDO DE ZINCO NA SAÚDE E MORFOLOGIA
INTESTINAL DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE**

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: 27 de julho de 2021.

Assentimento:



Maykelly da Silva Gomes
Autora



Gabriel Cipriano Rocha
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do mestrado e por me propiciar um ambiente repleto de oportunidades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA) pelo apoio financeiro.

Ao Professor Gabriel C. Rocha pela contribuição à minha formação, pelos conselhos, incentivo, ensinamentos e orientação durante o mestrado e na elaboração e execução deste trabalho.

Agradeço também aos professores da banca, Alysson Saraiva, Paulo Campos, Márcio Duarte e Francisco, pela disponibilidade, atenção e contribuições para este estudo.

Aos meus pais, Elizabete Custódia da Silva Gomes e José Geraldo do Carmo Gomes, que sempre apoiaram as minhas decisões, e nunca mediram esforços para me ajudar. Sem eles nada seria possível!

A minha irmã Larissa pela amizade e parceria.

Ao meu namorado Dante Jr. pelo carinho e companheirismo. Além do suporte no experimento, paciência e amizade.

Aos amigos que a UFV me proporcionou nos últimos anos, Amanda, Gustavo, Stefani, Lucas, Marcos, Gabryele e Erika pela amizade e ajuda durante a realização deste estudo. E também aos mais antigos, que enriqueceram minha jornada até aqui, Soraia, Lívia, Pauliane e Layla.

Aos funcionários da UEPE em Suinocultura, Fernando, Leandro, Arlindo, José Roberto, Valdeir e ao lendário Francisco, pela amizade e ensinamentos transmitidos ao longo dos anos.

Ao Grupo de Discussão em Suinocultura (GDSUI) pelo enriquecimento da minha carreira profissional.

A vocês, muito obrigada!

“Nolite te bastardest carborundorum” Margaret Atwood.

RESUMO

GOMES, Maykelly da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Efeito de probióticos e óxido de zinco na saúde e morfologia intestinal de leitões em fase de creche.** Orientador: Gabriel Cipriano Rocha. Coorientadores: Alysson Saraiva e Marcio de Souza Duarte.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos probióticos *B. amyloliquefaciens* (B.Amy) e *B. subtilis* (B.Sub) como alternativas ao óxido de zinco (ZnO) para leitões na fase de creche, sobre o desempenho, morfologia intestinal e expressão gênica associada à integridade epitelial e ativação do sistema imunológico. Foram utilizados 180 leitões, desmamados aos 21 dias de idade, com peso médio inicial de $6,2 \pm 0,85$ kg distribuídos em delineamento em blocos casualizados por peso inicial como controle local, com 9 repetições e 4 tratamentos: dieta controle (Controle), controle + 2,0 g/kg de zinco (ZnO), Controle + 1,0 g/kg *B. amyloliquefaciens* (B.Amy); e Controle + 1,0 g/kg *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg *B. subtilis* (B.Amy + B.Sub), por um período experimental de 41 dias (21 aos 62 dias de idade). Um animal de cada unidade experimental foi abatido aos 42 dias de idade para coleta de amostras intestinais. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) das dietas ZnO, B.Amy ou B.Amy + B.Sub sobre o consumo de ração médio diário, ganho de peso médio diário, conversão alimentar e peso médio nos três períodos avaliados. Animais suplementados com ZnO apresentaram maior relação vilo:cripta no íleo ($P < 0,05$) em comparação aos animais suplementados com B.Amy, além disso, houve redução no número de células apoptóticas no íleo ($P < 0,05$) e aumento da proliferação dos enterócitos no jejuno ($P < 0,05$), em comparação aos animais do tratamento Controle. A suplementação dos diferentes probióticos tiveram efeito similar ao ZnO e superior ao Controle ($P < 0,05$) no aumento da proliferação celular no jejuno. Neste mesmo tecido, B.Amy + B.Sub apresentaram menor abundância relativa de mRNA para o gene *NF-kB* ($P = 0,05$), quando comparado ao Controle. Conclui-se que a inclusão dos probióticos B.Amy e B.Sub, na dieta de leitões, podem resultar no estímulo à integridade intestinal e na diminuição das respostas inflamatórias.

Palavras-chave: Probióticos. Óxido de Zinco. Leitões desmamados. Saúde intestinal.

ABSTRACT

GOMES, Maykelly da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Effect of probiotics and zinc oxide on health and intestinal morphology of nursery piglets.** Adviser: Gabriel Cipriano Rocha. Co-advisors: Alysson Saraiva and Marcio de Souza Duarte.

The aim of the present study was to evaluate the effects of probiotics *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* as alternatives to zinc oxide (ZnO) for weaned piglets on performance, intestinal morphology and gene expression associated with epithelial integrity and activation of immune system. One hundred and eighty piglets, weaned at 21 days of age, with 6.2 ± 0.85 kg of average body weight were distributed in a randomized block design, according to body weight, with 9 replications and 4 treatments: diet without supplementation of zinc oxide and probiotics (Control), Control + 2.0 g/kg zinc (ZnO), Control + 1.0 g/kg *B. amyloliquefaciens* (B.Amy); and Control + 1.0 g/kg *B. amyloliquefaciens* + 0.5 g/kg *B. subtilis* (B.Amy + B.Sub). The trial lasted for 41 days (21 to 62 days of age). One animal from each experimental unit was slaughtered at 42 days of age to collect intestinal samples. There were no effects ($P > 0.05$) of ZnO, B.Amy or B.Amy + B.Sub diets on average daily feed intake, average daily weight gain, feed conversion and average body weight in any of the three phases evaluated. Animals supplemented with ZnO had higher villus:crypt ratio in the ileum ($P < 0.05$) compared to animals supplemented with B.Amy, in addition, there was a reduction in number of apoptotic cells in the ileum ($P < 0.05$) and an increase of enterocytes proliferation in the jejunum ($P < 0.05$) compared to control piglets. Supplementation of different probiotics had similar effect to ZnO and superior to Control ($P < 0.05$) in increasing cell proliferation in the jejunum. In addition, B.Amy + B.Sub diets presented lower mRNA relative abundance for NF-kB ($P = 0.05$) in the jejunum compared to Control. In conclusion, the inclusion of probiotics B.Amy and B.Sub in the piglets' diet, improves intestinal integrity and reduces inflammatory responses.

Keywords: Probiotics. Zinc oxide. Weaned piglets. Intestinal health.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Animais e instalações	9
2.2 Desenho experimental e dietas	9
2.3 Desempenho e abate	10
2.4 Coleta de amostras intestinais	10
2.5 Análise de morfologia intestinal	10
2.6 Contagem de células por imunofluorescência	11
2.7 Abundância relativa de mRNA	11
2.8 Análise Estatística	12
3 RESULTADOS	12
3.1 Desempenho	12
3.2 Morfologia intestinal	13
3.3 Contagem de células por imunofluorescência	13
3.4 Abundância relativa de mRNA	13
4 DISCUSSÃO	13
5 CONCLUSÃO	16
6 REFERÊNCIAS	16
ANEXOS	27

1 INTRODUÇÃO

O desmame precoce é um evento desafiador na vida dos leitões, que são submetidos a novo ambiente, interação social e dieta, causando mudanças na fisiologia, na morfologia e na microbiota gastrointestinal. Essas mudanças podem reduzir a função imunológica, a capacidade digestiva e absorptiva e aumentar a susceptibilidade a infecções por patógenos (Gresse et al., 2017).

O uso de óxido de zinco (ZnO) em níveis farmacológicos (1.000-3.000 mg/kg de ração) em dieta de leitões desmamados tem sido amplamente difundido, em que observar-se os benefícios da suplementação sobre o desempenho (Hill et al., 2001; Case & Carlson, 2002) e redução da incidência de diarreia (Hu et al., 2012). A ação do ZnO se deve à redução da adesão bacteriana, modulação da citocinas anti-inflamatórias, à alteração da microbiota intestinal e à melhoria da morfologia e da integridade intestinal (Roselli et al., 2003; Zhang e Guo, 2009; Song et al., 2015). No entanto, a utilização deste aditivo na produção de suínos tem sido relacionada ao aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Amachawadi et al., 2015; Slifierz et al., 2015) e a efeitos ambientais negativos (Jensen et al., 2018), o que culminou na necessidade de busca por alternativas ao uso do ZnO.

Nesse contexto, os probióticos (microrganismos vivos) tornaram-se possíveis alternativas ao ZnO uma vez que ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Dentre os possíveis mecanismos pelos quais os probióticos podem beneficiar o ambiente intestinal destaca-se a modulação da microbiota pela exclusão competitiva por locais de adesão e por substratos, redução de pH luminal e produção de substâncias com propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, melhora da digestibilidade de nutrientes pela atividade fermentativa, produção de enzimas e vitaminas; modulação das respostas imunológicas do hospedeiro e melhoria da morfologia e integridade intestinal (Liao e Nyachoti, 2017; Wen et al., 2018; Barba-Vidal et al., 2019).

Diversas cepas do gênero *Bacillus* podem ser utilizadas como probióticos na dieta de suínos. Larsen et al. (2013) investigaram *in vitro* 33 estirpes de *Bacillus* sendo que as pertencentes as espécies *B. amyloliquefaciens* (B.Amy) e *B. subtilis* (B.Sub) se destacaram quanto à inibição de patógenos, esporulação e produção de biofilmes. Além disso, estas cepas, têm demonstrado influenciar positivamente a colonização por bactérias favoráveis e a manutenção do microflora intestinal, resultando em melhor saúde intestinal, capacidade antioxidante e imunidade de leitões desmamados (Hu et al., 2018; Tian et al., 2021; Li et al., 2021).

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo é de que os probióticos dietéticos B.Amy e B.Sub representam uma alternativa à suplementação de ZnO, resultando em melhora no desempenho, na morfologia intestinal e na resposta imune de leitões desmamados.

Desta forma, este trabalho foi realizado para avaliar o efeito dos probióticos B.Amy e B.Sub como alternativas ao ZnO para leitões na fase de creche, sobre o desempenho, morfologia intestinal e expressão gênica associada à integridade epitelial e ativação do sistema imunológico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e instalações

O experimento seguiu os princípios éticos em pesquisa animal (CONCEA, 2016) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo nº 113/2019.

Cento e oitenta leitões (AGPIC 415 × Camborough) fêmeas e machos castrados, desmamados aos 21 dias de idade, com peso médio inicial de $6,2 \pm 0,85$ kg, foram utilizados em um período experimental de 41 dias. Os animais foram alojados em baias suspensas de 1,70 x 1,20m, em galpão comercial-experimental localizado em Oratórios-MG, Brasil. Cada baia abrigou cinco leitões com livre acesso a ração e água. As condições ambientais no interior do galpão foram monitoradas diariamente através de termômetro de máxima e mínima, mantido em uma baia vazia no centro galpão, à meia altura do corpo dos animais.

2.2 Desenho experimental e dietas

Aos 21d, os leitões foram distribuídos em delineamento em blocos casualizados por peso inicial, em quatro dietas: dieta sem suplementação de óxido de zinco e probióticos (Controle), Controle + 2,0 g/kg de zinco (ZnO), Controle + 1,0 g/kg *B. amyloliquefaciens* (B.Amy) e Controle + 1,0 g/kg *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg *B. subtilis* (B.Amy + B.Sub). Probióticos e ZnO foram adicionados em substituição ao milho na dieta Controle.

Com relação as especificações dos produtos utilizados. O probiótico composto por B.Amy possuía a garantia de contagem de esporos de no mínimo 1×10^9 ufc/g. Já o probiótico composto por B.Sub, de no mínimo 2×10^{10} ufc/g.

Foram utilizadas nove repetições para cada um dos grupos e três períodos de alimentação (21-31, 31-41 e 41-62 dias de idade). As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações propostas nas Tabelas Brasileiras

de Aves e Suínos, para cada período (Rostagno et al., 2017). No último período (41-62 dias de idade) o ZnO não foi adicionado à dieta ZnO.

2.3 Desempenho e abate

Ao longo do experimento, as rações foram pesadas antes do fornecimento e as sobras e os desperdícios de ração foram coletados e pesados diariamente para determinar o consumo de ração médio diário (CRD). Aos 21, 31, 41 e 62 dias de idade, os animais foram pesados individualmente para calcular o ganho de peso médio diário (GPD), a conversão alimentar (CA) e peso médio ao final de cada fase.

Aos 42 dias de idade, após período de jejum de 12h, um animal de cada unidade experimental, com peso mais próximo à média de sua respectiva unidade experimental, foi insensibilizado por eletronarcolese, seguido de sangria para coleta de amostras.

2.4 Coleta de amostras intestinais

Segmentos medindo 2,0 cm do intestino foram amostrados correspondendo ao jejuno (porção média do intestino) e íleo (a 5,0 cm anterior a junção ileo-cecal), de acordo com Yang et al. (2014). Os cortes histológicos foram lavados em solução fisiológica e fixados em solução de paraformaldeído 4,0% por 24 horas à temperatura ambiente, e posteriormente transferidas para etanol 70% e armazenadas até as análises.

As amostras de jejuno e íleo destinadas a análise de expressão gênica de citocinas e proteínas de junção, foram lavados com soro fisiológico estéril, com auxílio de bisturi foram coletadas cerca de dez subamostras de 0,25 cm³, alocadas em criotubos, congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

2.5 Análise de morfologia intestinal

As amostras histológicas foram cortadas transversalmente e desidratados em soluções de diferentes concentrações de etanol, diafanizados em HistoChoice® e incluídos em Paraplast® líquido a 65°C. Os cortes foram semi-seriados usando 1 a cada 10 cortes, à 5 µm de espessura, e corados com hematoxilina e eosina.

Para leituras morfológicas, foram fotografados cerca de 10 campos por animal em microscópio óptico (Olympus® BX50, Tóquio, Japão) com objetiva de 4x, acoplado à câmera Biocam® 3,5 MP, utilizando o programa TSVIEW 7.3.1.7. As imagens foram analisadas através do programa ImageJ 1.50i; java1.6.0_20 (National Institutes of Health). Alturas de 20

vilosidades e suas 20 criptas foram selecionadas e medidas. A relação vilo:cripta foi computada. Todas as medidas foram feitas por um único indivíduo.

2.6 Contagem de células por imunofluorescência

Os cortes histológicos dos segmentos do jejuno e íleo foram fixados em solução de paraformaldeído, desidratados em soluções de diferentes concentrações de etanol, diafanizados em HistoChoice® e incluídos em Paraplast® líquido, da mesma forma que as amostras destinadas à avaliação morfológica. A recuperação de antígeno foi realizada em tampão citrato (pH 6,0) a 95°C por 3 min. Os cortes foram bloqueados com 2% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich) por 20 min, em seguida as lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C em uma câmara úmida com anti-ki67, 1: 400 em BSA2% (Cell Signaling Technology, Cat # 9449) para proliferação celular, anti-caspase-3, 1:400 em BSA2% (Cell Signaling Technology, Cat # 9664) para indicar apoptose celular e anti-CD79A, 1: 100 em BSA2% (Cell Signaling Technology, Cat # 3351) para marcação de linfócitos B. Posteriormente, as seções foram incubadas com anticorpos secundários por 1h em temperatura ambiente em câmara úmida escura. Foram usados anticorpos IgG F(ab')₂ anti-mouse (conjugado com Alexa Fluor 594) (Cell Signaling Technology, Cat# 8890) para células em proliferação, anticorpo IgG F(ab')₂ anti-rabbit (conjugado com Alexa Fluor 488) (Cell Signaling Technology, Cat # 8889) para lâminas marcadas para células apoptóticas e linfócitos B, 1: 500 em BSA2%. Após cada etapa de incubação, os cortes foram lavados com TBS1X. As lâminas foram montadas com ProLong® Gold Antifade Reagent com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Life Technologies).

Foram fotografados 10 campos/animal usando o microscópio de fluorescência invertido EVOS M5000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), com objetiva de 20x. Em seguida, as imagens foram analisadas pelo programa ImageJ 1.50i; java1.6.0_20 (National Institutes of Health). A área marcada das imagens foi quantificada. O controle negativo foi conduzido seguindo o protocolo descrito acima sem a etapa de incubação usando os anticorpos anti-ki67, anti-caspase-3 e anti-CD79A.

2.7 Abundância relativa de mRNA

A extração de RNA total foi realizada usando TRIzol® (Invitrogen™) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada por NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific), e a integridade de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A síntese complementar de DNA foi realizada de acordo com o protocolo GoScript™ Reverse

Transcription System (Promega Corporation). O desenho dos primers e respectivos códigos de acesso do GenBank constam na Tabela 1. Os primers foram usados para PCR quantitativo de transcrição reversa com GoTaq qPCR Master Mix (Promega) em QuantStudio® 3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Médias geométricas dos valores de Ct de β -actina e B2M foram utilizadas para normalizar a expressão de genes alvo, para as amostras de jejuno e íleo, respectivamente. A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

2.8 Análise Estatística

A baía foi considerada a unidade experimental para as análises de desempenho. Um animal de cada baía, abatido aos 41 dias de idade, foi considerado a unidade experimental para as análises de morfologia intestinal, expressão gênica e imunofluorescência. Os dados foram analisados usando o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} é o valor da variável resposta observado no j -ésimo bloco do i -ésimo nível do fator em teste; μ é a média populacional dos valores da variável resposta; T_i é o efeito do i -ésimo nível do fator que está sendo testado; β_j é o efeito do j -ésimo bloco no valor observado y_{ij} ; e e_{ijk} é o erro experimental associado ao valor observado y_{ij} , assumindo $e_{ijk} \sim (0, \sigma_e^2)$.

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS 9.4 (SAS Inst., Inc., Cary, NC, EUA) licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. A normalidade e a homogeneidade dos resíduos foram verificados a 5% de significância antes das análises finais, conforme apropriado. Quando as pressuposições foram atendidas, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de significância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey e os efeitos foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Realizou-se a investigação de *outliers* pela função "lm" nos dados de expressão gênica.

3 RESULTADOS

3.1 Desempenho

Não houve efeito ($P > 0,05$) da suplementação de ZnO, B.Amy ou B.Amy + B.Sub sobre CRD, GPD, CA e peso médio final nas três fases avaliadas (Tabela 2). As temperaturas máxima e mínima dentro do galpão foram por período $30,6 \pm 1,34^\circ\text{C}$ e $21,5 \pm 2,20^\circ\text{C}$, respectivamente.

Durante o período experimental foram retirados dois animais, no terceiro período, dos 41 aos 62 dias.

3.2 Morfologia intestinal

No jejuno, a altura das vilosidades, a profundidade das criptas e as relações vilo:cripta não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelas dietas (Tabela 3).

No íleo, a relação vilo:cripta dos animais alimentados com a dieta ZnO foi maior ($P < 0,05$) comparado aos leitões que consumiram a dieta B.Amy. As dietas Controle e B.Amy + B.Sub proporcionaram resultados intermediários. Porém, não houve efeito ($P > 0,05$) das dietas na altura das vilosidades e na profundidade das criptas no íleo.

3.3 Contagem de células por imunofluorescência

No jejuno, os animais suplementados com ZnO e probióticos apresentaram maior ($P < 0,05$) número de células em proliferação (células positivas para Ki67) comparado aos animais alimentados com a dieta Controle (Figura 1). No entanto, não houve efeito ($P > 0,05$) das dietas nas células apoptóticas (células positivas para caspase-3) e linfócitos B (células positivas para CD79A).

No íleo, houve redução ($P < 0,05$) do número de marcações de células apoptóticas nos animais alimentados com ZnO em relação aos animais do grupo Controle (Figura 1). Os grupos B.Amy e B.Amy + B.Sub apresentaram resultados intermediários. No entanto, não houve efeito ($P > 0,05$) das dietas nas células proliferativas e nas células de linfócitos B.

3.4 Abundância relativa de mRNA

No jejuno, a abundância relativa de mRNA para o gene NF-kB dos animais alimentados com B.Amy + B.Sub foi menor ($P = 0,05$) quando comparado a dieta Controle, e as dietas ZnO e B.Amy proporcionaram resultados intermediários (Tabela 4). No entanto, a expressão de mRNA do TNF- α , TGF β , MAPK, OCL e ZO1 não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos.

No íleo, a abundância relativa de mRNA para os genes TNF- α , TGF β , MAPK, NF-kB e OCL não foi influenciada ($P > 0,05$) pelas dietas.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a hipótese de que os probióticos dietéticos B.Amy e B.Sub representam uma alternativa à suplementação de ZnO como promotor de crescimento, resultando em melhora no desempenho, na morfologia intestinal e na resposta imune de leitões desmamados.

Neste trabalho não foi observado efeito da suplementação de ZnO e dos probióticos avaliados, no desempenho dos leitões. Ausência de diferença significativa no desempenho de suínos tem sido relatada em estudos que avaliaram o uso de probióticos (Broom et al., 2006; Becker et al., 2020). Os aditivos podem ter suas ações influenciadas por diversos fatores, como saúde e idade dos animais, a digestibilidade dos ingredientes da ração, manejo, tipo de desafio, bem como a dosagem utilizada (Liu et al., 2018).

O jejuno e íleo desempenham papel fundamental na digestão, absorção e transporte de nutrientes. A função absorptiva está diretamente relacionada à altura das vilosidades e, conseqüentemente, a proliferação e apoptose dos enterócitos no lúmen intestinal (Tang et al., 2019, Wang et al., 2018). As caspases são os executores finais da apoptose em quase todos os tipos de células, provocando a degradação dos componentes celulares e da cromatina. A apoptose excessiva das células das vilosidades pode causar encurtamento das mesmas (Ramachandran et al., 2000). Além disso, existe uma relação positiva entre a proliferação dos enterócitos e a altura das vilosidades (Wang et al., 2018; Valine et al., 2021).

No presente estudo o uso da dieta ZnO, comparado à dieta B.Amy, resultou em aumento da relação vilosidade:cripta no íleo. Ademais, quando comparado ao Controle, o tratamento com ZnO apresentou valor 15% superior para a relação vilosidade:cripta. O efeito da dieta ZnO na mucosa também pode ser observado pela redução da marcação de células em apoptose no íleo e pelo aumento da proliferação dos enterócitos no jejuno. Estes resultados sugerem uma estrutura de mucosa mais favorável para melhor digestibilidade de nutrientes e capacidade absorptiva dos animais.

O efeito benéfico dos probióticos sobre a mucosa intestinal pode ser observado pelo aumento da proliferação celular, no jejuno, dos leitões suplementados com B.Amy e B.Amy + B.Sub em relação à dieta Controle. Park et al. (2016) sugeriram que bactérias comensais são importantes para a promoção da proliferação e renovação de células intestinais. Isso é devido, em parte, pela contribuição para a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGVs), principalmente acetato, propionato e butirato (Park et al., 2016).

O butirato é uma fonte de energia primária para os enterócitos, apoiando a homeostase intestinal por meio de ações anti-inflamatórias, reforçando seu papel no suporte à proliferação de células epiteliais (Venegas et al., 2019; Martin-Gallausiaux et al., 2020). Além disso, têm efeito inibitório sobre a atividade de histonas deacetilases, afetando a regulação gênica da proliferação celular, diferenciação e resposta inflamatória (Venegas et al., 2019, Silva et al., 2020). Além disso, os AGVs atuam como ligantes para os receptores acoplados à proteína G (GPRs), como GPR41 e GPR43 (Park et al., 2016; Venegas et al., 2019). AGVs são conhecidos

por ativar a sinalização de proteínas quinases ativadas por mitogênio (ERK) através das GPRs, promovendo a atividade proliferativa e turnover de células epiteliais intestinais por bactérias comensais (Park et al., 2016).

Nossos achados são corroborados por trabalhos que utilizaram cepas de *Bacillus* na dieta de leitões desmamados e verificaram melhoria na expressão de genes relacionados a proliferação celular. Tang et al. (2019) demonstraram que a combinação de uma dieta com baixos níveis de proteína com a suplementação de B.Sub, resultou no aumento da expressão dos genes EGF, GLP-2 e IGF-1R na mucosa ileal, fatores de crescimento, proliferação e diferenciação epitelial intestinal.

No presente estudo, apesar da ausência de significância para a marcação de células apoptóticas nos grupos B.Amy e B.Amy + B.Sub, houve redução de 35 e 38%, respectivamente, em relação à dieta Controle no íleo. Li et al. (2018) observaram que a suplementação de B.Amy na dieta de leitões desmamados com crescimento intrauterino retardado, atenuou o índice apoptótico tanto no jejuno quanto no íleo. Outros estudos forneceram evidências de que os probióticos atuam na prevenção da apoptose epitelial por meio da melhoria no desenvolvimento da mucosa (Fujiya et al., 2007; Ji et al., 2013; Hu et al., 2016).

O estresse causado pelo desmame provoca alterações fisiológicas, frequentemente acompanhados pelo aumento da ativação do sistema imune. Isso pode ser demonstrado pela produção de citocinas, moléculas que desempenham papel fundamental nas respostas imunológicas e inflamatórias no trato gastrointestinal (Hu et al., 2013). Além disso, as proteínas de junção são importantes na manutenção da integridade intestinal e função de barreira, sendo que, sua expressão também é afetada negativamente pelo desmame dos animais (Gresse et al., 2017).

Trabalhos presentes na literatura relataram o benefício do uso de B.sub sobre a função da barreira intestinal e imunidade de leitões desmamados (Kim et al., 2019; Tian et al., 2021), e propuseram que os probióticos possuem a capacidade de suprimir o estado inflamatório associado à transição do desmame. Neste estudo, leitões alimentados com B.Amy + B.Sub apresentaram menor expressão de mRNA do gene NF- κ B no jejuno, em comparação ao Controle.

As células intestinais expressam em sua superfície receptores *toll-like* (TLRs) que reconhecem componentes estruturais de diferentes microrganismos (Roselli et al., 2017). No estado não inflamatório, o NF- κ B é mantido em sua forma citosólica inativa complexada com a proteína inibitória I κ B. A ligação de patógenos a TLRs resulta na ativação do NF- κ B, através da fosforilação do seu inibidor, resultando em sua translocação para o núcleo e na produção

transcricional de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para a defesa e inflamação do hospedeiro (Petrof et al., 2004; Roselli et al., 2017).

Diao et al. (2014) demonstraram que o polissacarídeo extracelular bioativo de *Bacillus* sp. LBP32 suprimiu a ativação induzida, por lipopolissacarídeo, de NF- κ B em células de macrófagos. Petrof et al., (2004) mostraram que os efeitos benéficos de uma formulação probiótica na mucosa intestinal devido ao bloqueio da atividade de NF- κ B, decorrente da inibição de proteassoma. Li et al. (2018) propuseram que entre os mecanismos pelos quais o B.amy regula o estado inflamatório, está a liberação de surfactina. A surfactina é uma composto biologicamente ativo com atividades surfactantes, que pode ser produzida por várias espécies de *Bacillus*. Park e Kim, (2009) indicaram que a surfactina inibe a ativação de NF- κ B, bloqueando sua translocação do citosol para o núcleo, em macrófagos peritoneais de camundongos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências de que a inclusão dos probióticos B.Amy e B.Sub na dieta de leitões, estimulam a integridade intestinal e diminuem a resposta inflamatória.

6 REFERÊNCIAS

- Amachawadi, R.G., Scott, H.M., Nitikanchana, S., Vinasco, J., Tokach, M.D., Dritz, S.S., Nelssen, J.L., Goodband, R.D., Nagaraja, T.G. Nasal carriage of mecA-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs exhibits dose-response to zinc supplementation. **Foodborne Pathogens and Disease**, 12, p.159–163, 2015.
- Barba-Vidal, E., Martín-Orúe, S. M., & Castillejos, L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A Review. **Livestock Science**. V.223, P.84-96, 2019.
- Becker, S. L., Li, Q., Burrough, E. R., Kenne, D., Sahin, O., Gould, S. A., & Patience, J. F. Effects of an F18 enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge on growth performance, immunological status and gastrointestinal structure of weaned pigs and the potential protective effect of direct-fed microbial blends. **Journal of Animal Science**, Vol. 98, No. 5, 1–10, 2020.

- Broom, L. J., Miller, H. M., Kerr, K. G., and Knapp, J. S. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. **Research in Veterinary Science**, 80(1), 45–54, 2006.
- Case, C. L., Carlson, M. S. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1917–1924, 2002.
- Diao, Y., Xin, Y., Zhou, Y., Li, N., Pan, X., Qi, S., ... Yin, Z. Extracellular polysaccharide from *Bacillus* sp. strain LBP32 prevents LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF- κ B and MAPKs activation and ROS production. **International Immunopharmacology**, 18(1), 12–19, 2014.
- FAO/WHO. Joint FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. 1-11, 2002
- Fujiya, M., Musch, M. W., Nakagawa, Y., Hu, S., Alverdy, J., Kohgo, Y., ... Chang, E. B. The *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter. **Cell Host & Microbe**, 1(4), 299–308, 2007.
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., e Blanquet-Diot, s. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. **Trends in Microbiology**, 25(10), 851–873, 2017.
- Hill, G. M., Mahan, D. C., Carter, S. D., Cromwell, G. L., Ewan, R. C., Harrold, R. L., Lewis, A. J., Miller, P. S., Shurson, G. C., Veum, T. L. Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. **Journal of Animal Science**, 79, p. 934– 941, 2001.
- Hu C, Song J, You Z, Luan Z, Li W. Zinc Oxide-Montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs. **Biological Trace Element Research**, p. 149-190, e6, 2012.
- Hu CH, Xiao K, Luan ZS and Song J. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs1. **Journal of Animal Science**, 91, 1094–1101, 2013.
- Hu, L., Peng, X., Chen, H., Yan, C., Liu, Y., Xu, Q., ... Che, L. Effects of intrauterine growth retardation and *Bacillus subtilis* PB6 supplementation on growth performance, intestinal development and immune function of piglets during the suckling period. **European Journal of Nutrition**, 56(4), 1753–1765, 2016.

- Hu, S., Cao, X., Wu, Y., Mei, X., Xu, H., Wang, Y., ... Li, W. Effects of Probiotic *Bacillus* as an Alternative of Antibiotics on Digestive Enzymes Activity and Intestinal Integrity of Piglets. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.
- Jensen, J., Kyvsgaard, N.C., Battisti, A., Baptiste, K.E. Environmental and public health related risk of veterinary zinc in pig production – using Denmark as an example. **Environment International**. 114, p.181–190, 2018.
- Ji, J., Hu, S., Zheng, M., Du, W., Shang, Q., & Li, W. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 inhibits ETEC-induced pro-inflammatory responses by suppression of MAPK signaling pathways in IPEC-1 cells and diarrhea in weaned piglets. **Livestock Science**, 158(1-3), 206–214, 2013.
- Kim, K., He, Y., Xiong, X., Ehrlich, A., Li, X., Raybould, H., ... Liu, Y. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* influenced intestinal health of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 10(1), 2019.
- Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, E. N., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, M. D., Nielsen, B. Brockmann, E., Derkx, P. M. F., Jespersen, L. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(3), 1105–1118, 2013.
- Li, X., Yin, J., Li, D., Chen, X., Zang, J., & Zhou, X. Dietary Supplementation with Zinc Oxide Increases IGF-I and IGF-I Receptor Gene Expression in the Small Intestine of Weanling Piglets. **The Journal of Nutrition**, 136(7), 1786–1791, 2006.
- Li, Y., Zhang, H., Su, W., Ying, Z., Chen, Y., Zhang, L., ... Wang, T. Effects of dietary *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation on growth performance, intestinal morphology, inflammatory response, and microbiota of intra-uterine growth retarded weanling piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 9(1), 2018.
- Li, H., Jiang, X., and Q, J. Effect of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance and serum biochemical and immune indexes in weaned piglets, **Journal of Applied Animal Research**, 49:1, 83-88, 2021.
- Liao, S. F., & Nyachoti, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. **Animal Nutrition**, 3(4), 331–343, 2017.
- Liu, Y., Espinosa, C. D., Abelilla, J. J., Casas, G. A., Lagos, L. V., Lee, S. A., Kwon, W. B., Mathai, J. K., Navarro, D. M. D. L., Jaworski, N. W., and Stein, H. H. Non antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. **Anim Nutr** 4, 113–125, 2018.

- Liu, H., Hu, J., Mahfuz, S., & Piao, X. Effects of Hydrolysable Tannins as Zinc Oxide Substitutes on Antioxidant Status, Immune Function, Intestinal Morphology, and Digestive Enzyme Activities in Weaned Piglets. **Animals**, 10(5), 757, 2020.
- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P., & Lapaque, N. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. **Proceedings of the Nutrition Society**, 1–13, 2020.
- Park, S. Y., and Kim, Y. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK- κ B, MAPK and Akt pathway. **International Immunopharmacology**, 9(7-8), 886–893, 2009.
- Park, J., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., ... Matozaki, T. (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. **PLOS ONE**, 11(5), e0156334, 2016.
- Park, J., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., Murata, Y., Matozaki, T. Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. **PLOS ONE**, 11(5), e0156334, 2016.
- Petrof, E. O., Kojima, K., Ropeleski, M. J., Musch, M. W., Tao, Y., De Simone, C., & Chang, E. B. Probiotics inhibit nuclear factor- κ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. **Gastroenterology**, 127(5), 1474–1487, 2004.
- Ramachandran, A., Madesh, M., & Balasubramanian, K. A. Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 15(2), 109–120, 2000.
- Roselli, M., Finamore, A., Garaguso, I., Britti, M.S., Mengheri, E. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by Escherichia coli. **J. The Journal of Nutrition**, v.133, n.12, p.4077–4082, 2003.
- Roselli, M., Pieper, R., Rogel-Gaillard, C., de Vries, H., Bailey, M., Smidt, H., & Lauridsen, C. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. **Animal Feed Science and Technology**, 233, 104–119, 2017.
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M.I., Donzele, J. L., Sakomura, N.K., Perazzo, F.G., Saraiva, A., ... Brito, C.O. Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais, Viçosa: **Departamento de Zootecnia**, UFV, 4.ed, p. 444, 2017.
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in Endocrinology**, 11, 2020.

- Slifierz, M. J., Friendship, R., Weese, J. S. Zinc oxide therapy increases prevalence and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs: a randomized controlled study. **Zoonoses Public Health**. V.62, p.301–308, 2015.
- Song, Z. H., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H. Zinc oxide influences mitogen-activated protein kinase and TGF-beta 1 signaling pathways, and enhances intestinal barrier integrity in weaned pigs. **Innate Immunity**, 21, p.341–348, 2015.
- Tang, W., Qian, Y., Yu, B., Zhang, T., Gao, J., He, J., Huang, Z., Zheng, P., Mao, X., Luo, J., Yu, J Chen, D. Effects of *Bacillus subtilis* DSM32315 supplementation and dietary crude protein level on performance, barrier function and gut microbiota profile in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, 2019.
- Tian, Z., Wang, X., Duan, Y., Zhao, Y., Zhang, W., Azad, M. A. K., Wang, Z., Blachier, F., and Kong, X. Dietary Supplementation With *Bacillus subtilis* Promotes Growth and Gut Health of Weaned Piglets. **Front. Vet. Sci.** 7:600772, 2021.
- Valini, G. A. C., Duarte, M. S., Calderano, A. A., Teixeira, L. M., Rodrigues, G. A., Fernandes, K. M., Veroneze, R., Serão, N. V. L., Mantovani, H. C., Rocha, G.C. Dietary nucleotide supplementation as an alternative to in-feed antibiotics in weaned piglets, **Animal**, V.15, I.1, 2021.
- Venegas, D. P., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., and Hermoso, M. A. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Front. Immunol.** 10:277, 2019.
- Wang, L. X., Yan, S. L., Li, J. Z., Li, Y. L., Ding, X. Q., Yin, J., ... Yin, Y. L. Rapid Communication: The relationship of enterocyte proliferation with intestinal morphology and nutrient digestibility in weaning piglets. **Journal of Animal Science**, 2018.
- Wen, C. L., Ye, M., Jia, H. L., Zhi, H. Z., Kim, I. H., & Li, L. A. (2018). Application of complex probiotics in swine nutrition – A review. *Annals of Animal Science*, 18(2), 335-350.
- Xia, T., Lai, W., Han, M., Han, M., Ma, X., & Zhang, L. Dietary ZnO nanoparticles alters intestinal microbiota and inflammation response in weaned piglets. **Oncotarget**, 8(39), 2017.
- Yang, K. M., Jiang, Z. Y., Zheng, C. T., Wang, L., & Yang, X. F. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. **Journal of Animal Science**, 92(4), 1496-1503, 2014.

Zhang, B., Guo, Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. **British Journal of Nutrition**, 102, p.687–693, 2009.

Tabela 1 Lista de *primers* utilizados na análise da expressão gênica relativa tecidual por PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) em leitões.

Genes ¹	Número GenBank	Sequência ²	Tamanho, bp
TNF- α	X57321.1	F:5'AGGACTCAGATCATCGTCTC3' R:5'CATACCCACTCTGCCATTG3'	234
TGF β 1	NM_214015.1	F:5'GGACCTTATCCTGAATGCCTT3' R:5'TAGGTTACCACTGAGCCACAAT3'	133
Occludin	NM_001163647.2	F:5'CGGGAAAGTGAACGAGAAG3' R:5'CCACTGCTGCTGTAATGAG3'	244
ZO-1	XM_003353439.2	F:5'AAGCCCTAAGTTCAATCACAATCT3' R:5'ATCAAACCTCAGGAGGCGGC3'	130
MAPK	XM_021095339.1	F:5'GGAGCTTCTCAGCGTAATTC3' R:5'CAGGAAATCCAGTGCTTCTC3'	138
NF- κ B	NM_001048232.1	F:5'GAGGTGCATCTGACGTATTC3' R:5'AAGTTGCATGGCCTTCTC3'	169
β -actin	U07786.1	F:5'CTCTTCCATCGTGTCCCTTCTAC3' R:5'CCTCAGACTTGTCGATCTTCTG3'	706
B2M	NM_213978.1	F:5'TGAAAAACGGGGAGAAGATG3' R:5'GTGATGCCGGTTAGTGGTCT3'	189

¹ TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; TGF β 1, fator de crescimento transformador- β 1; ZO-1, zônula ocludens-1; MAPK-6, proteína quinase ativada por mitógeno; NF- κ B, fator nuclear kappa B; B2M, β -2-microglobulina.

² F e R indicam *Forward* e *Reverse*, respectivamente.

Tabela 2 Efeito da suplementação de óxido de zinco e probióticos sobre o desempenho de leitões desmamados.

Item	Dieta ¹				EMP ²	P-valor
	Controle	ZnO	B.Amy	B.Amy + B.Sub		
21 a 31 d						
Peso médio inicial, kg	6,2	6,2	6,2	6,2	0,55	-
GPD, g	248	232	245	247	16,1	0,74
CRD, g	254	260	259	263	15,5	0,96
CA	1,03	1,12	1,06	1,07	0,03	0,21
Peso médio 31d, kg	8,7	8,54	8,67	8,68	0,69	0,79
21 a 41 d						
GPD, g	355	320	341	347	16,9	0,12
CRD, g	412	386	416	411	18,3	0,70
CA	1,16	1,24	1,22	1,18	0,02	0,06
Peso médio 41d, kg	13,3	12,6	13,0	13,1	0,85	0,12
21 a 62 d						
GPD, g	521	505	508	529	19,9	0,29
CRD, g	738	728	731	758	33,9	0,54
CA	1,42	1,44	1,44	1,43	0,02	0,67
Peso médio 62d, kg	27,6	26,9	27,0	27,9	1,33	0,29

¹ As dietas experimentais foram obtidas pela adição de 2,0 g/kg de zinco (ZnO), 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* (B.Amy) ou 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg de *B. subtilis* (B.Amy + B.Sub) em substituição ao milho na dieta Controle. Na última fase (41-62 dias de idade) o ZnO não foi adicionado à dieta ZnO.

² Erro padrão da média.

Tabela 3 Efeito da suplementação de óxido de zinco e probióticos na morfologia intestinal de leitões 20 dias após o desmame.

Item	Dieta ¹				EPM ²	P-valor
	Controle	ZnO	B.Amy	B.Amy + B.Sub		
<i>Jejuno</i>						
Altura de vilosidade, μm	267	291	286	290	12,0	0,45
Profundidade de cripta, μm	218	222	204	200	10,7	0,40
Relação vilo:cripta	1,31	1,37	1,51	1,53	0,07	0,18
<i>Íleo</i>						
Altura de vilosidade, μm	226	238	221	224	10,8	0,60
Profundidade de cripta, μm	175	155	171	169	8,5	0,44
Relação vilo:cripta	1,40 ^{ab}	1,65 ^a	1,38 ^b	1,42 ^{ab}	0,08	0,02

¹ As dietas experimentais foram obtidas pela adição de 2,0 g/kg de zinco (ZnO), 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* (B.Amy) ou 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg de *B. subtilis* (B.Amy + B.Sub) em substituição ao milho na dieta Controle.

² Erro padrão da média.

^{a, b} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Tabela 4 Efeito da suplementação de óxido de zinco e probióticos na abundância relativa de mRNA de marcadores inflamatórios e proteínas de junção no jejuno e íleo de leitões 20 dias após o desmame.

Item ²	Dieta ¹				EPM ³	P-valor
	Controle	ZnO	B.Amy	B.Amy + B.Sub		
<i>Jejuno</i>						
TNF α	0,877	0,901	0,610	1,059	0,119	0,72
TGF β	2,083	2,890	2,348	2,399	0,444	0,20
MAPK	0,267	0,260	0,290	0,305	0,174	0,85
NF- κ B	1,059 ^a	1,001 ^{ab}	0,813 ^{ab}	0,608 ^b	0,303	0,05
OCL	0,668	0,672	0,791	0,860	0,352	0,54
ZO1	0,135	0,146	0,115	0,139	0,306	0,93
<i>Íleo</i>						
TNF α	0,335	0,396	0,217	0,252	0,233	0,56
TGF β	1,401	1,100	1,479	1,162	0,220	0,84
MAPK	0,829	0,641	0,954	0,723	0,040	0,51
NF- κ B	1,873	1,525	1,791	1,647	0,141	0,86
OCL	1,158	1,369	1,774	1,255	0,099	0,51

¹ As dietas experimentais foram obtidas pela adição de 2,0 g/kg de zinco (ZnO), 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* (B.Amy) ou 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg de *B. subtilis* (B.Amy + B.Sub) em substituição ao milho na dieta Controle.

² TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; TGF β 1, fator de crescimento transformador- β 1; ZO-1, zônula ocludens-1; MAPK-6, proteína quinase ativada por mitógeno; NF- κ B, fator nuclear kappa B; B2M, β -2-microglobulina.

³ Erro padrão da média.

^{a, b} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

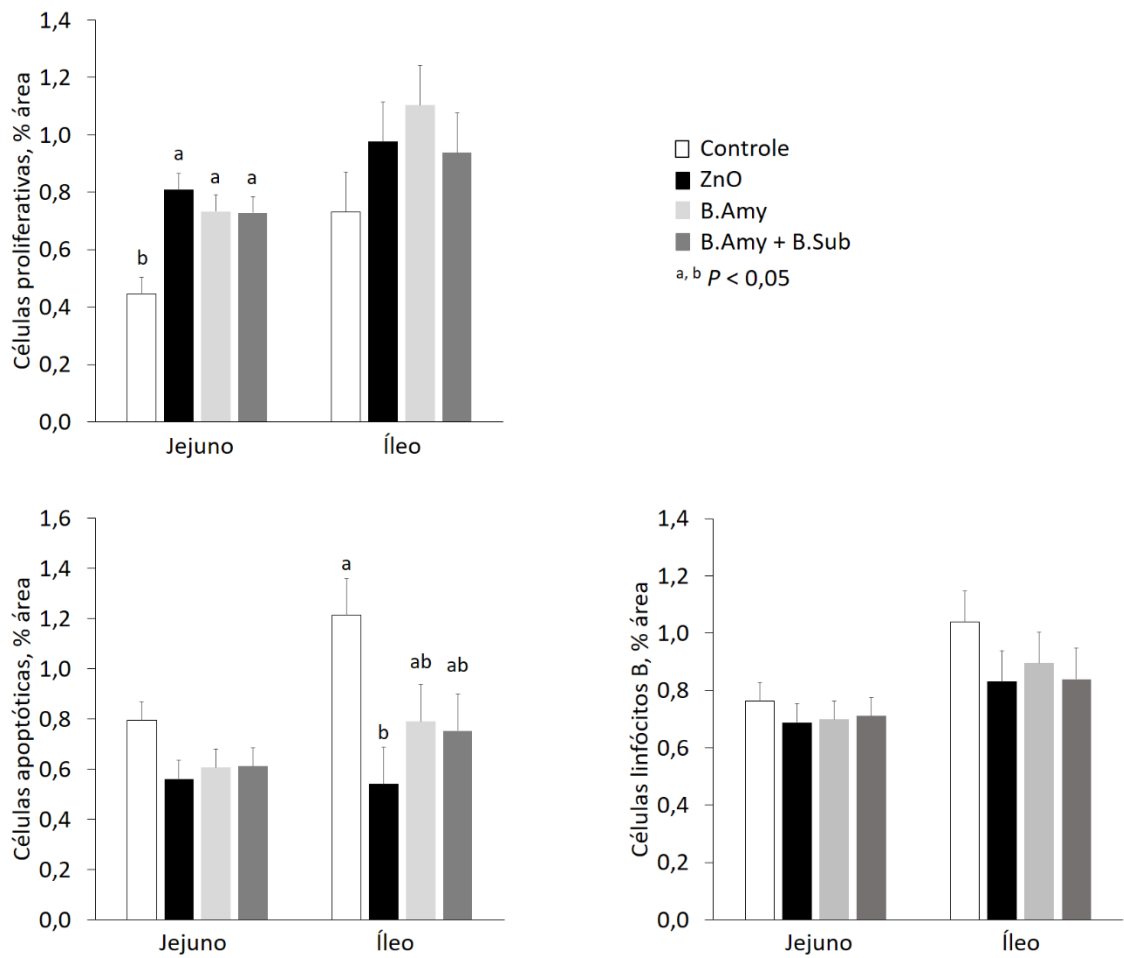


Figura 1 Efeito da suplementação de óxido de zinco e de probióticos na marcação de células Ki67 positivas (proliferação celular), Caspase-3 (apoptose celular) e CD79A (linfócitos B) no intestino delgado de leitões, 20 dias após o desmame. Controle = sem adição de ZnO e probióticos, ZnO = Controle + 2,0 g/kg de zinco, B.Amy = Controle + 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens* e B.Amy + B.Sub = Controle + 1 g/kg *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg de *B. subtilis*.

ANEXOS

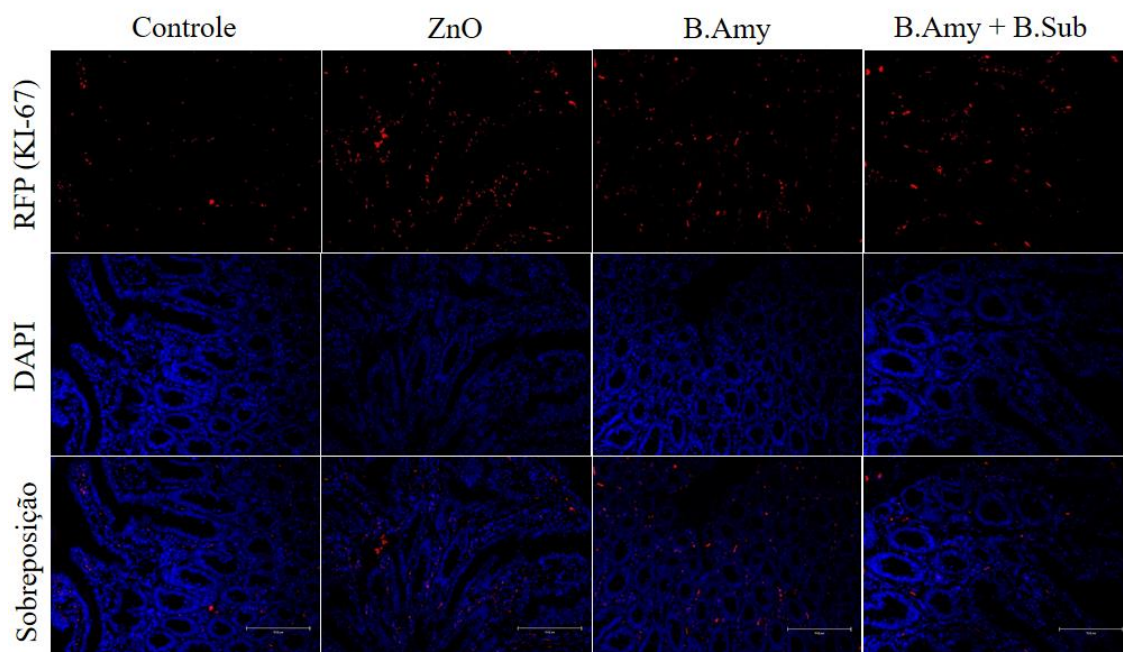


Figura 2 Efeito da suplementação de ZnO e probióticos na marcação de células proliferativas no intestino delgado de leitões. Imagens representativas que mostram o reconhecimento de células com base na intensidade de fluorescência do anticorpo na vilosidade e na cripta do jejuno. Células positivas para Ki67 (fluorescência vermelha) e núcleos celulares corados com DAPI. Ampliação de 20 ×.

* Controle para dieta sem adição de ZnO e probióticos; ZnO para Controle mais 2,0 g/kg de zinco; B.Amy para Controle mais 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens*; e B.Amy + B.Sub para Controle mais 1 g/kg *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg de *B. subtilis*.

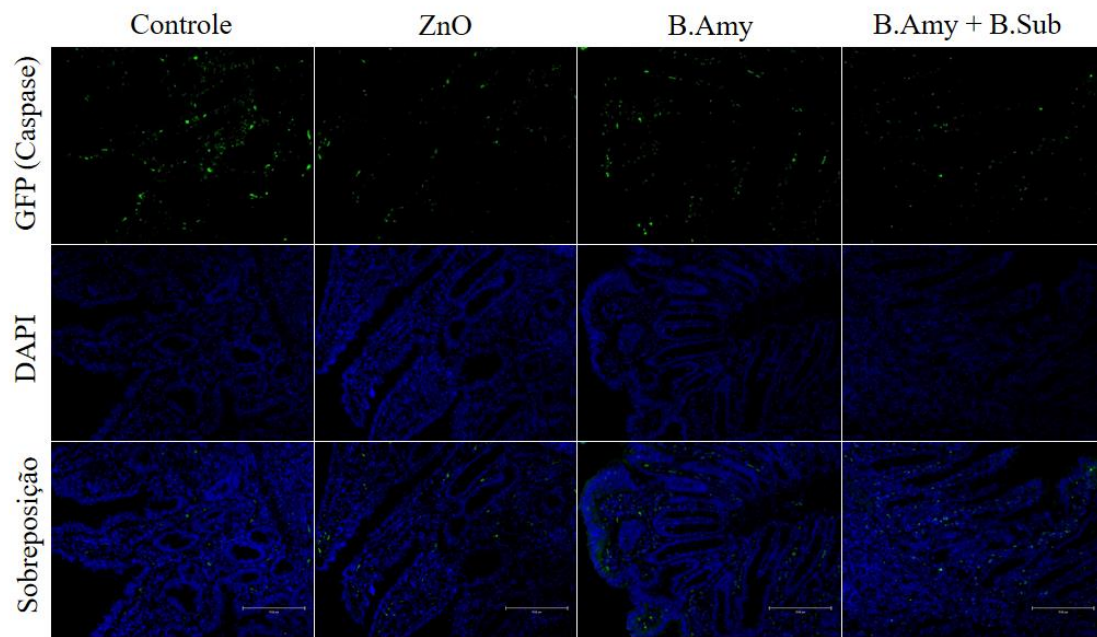


Figura 3 Efeito da suplementação de ZnO e probióticos na marcação de células apoptóticas no intestino delgado de leitões. Imagens representativas que mostram o reconhecimento de células com base na intensidade de fluorescência do anticorpo na vilosidade e na cripta do íleo. Células positivas para Caspase-3 (fluorescência verde) e núcleos celulares corados com DAPI. Ampliação de 20 ×.

* Controle para dieta sem adição de ZnO e probióticos; ZnO para Controle mais 2,0 g/kg de zinco; B.Amy para Controle mais 1 g/kg de *B. amyloliquefaciens*; e B.Amy + B.Sub para Controle mais 1 g/kg *B. amyloliquefaciens* + 0,5 g/kg de *B. subtilis*.



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, 10 de Out. de 2019

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Probiótico como alternativa ao uso de óxido de zinco como promotor de crescimento em dietas para suínos em fase de creche (21 aos 63 dias de idade)**", protocolo n° **0113/2019**, 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi apreciado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **16 de Setembro de 2019**.

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

Vigência do Projeto: de **10 de Out. de 2019** a **Novembro de 2020**

Espécie/linhagem: **Suíno (*Sus Domesticus*)** N° de animais:

Peso: **6 kg** Idade: **21 dias** Sexo: **Macho/Fêmea** Origem: **Setor de Suinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Probiotic as an alternative to the use of zinc oxide as growth promoter for nursery pigs (21 to 63 days age)**", protocol n° **0113/2019**, 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 n°. 11.794, of October 8, 2008, Decree n°. 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 **Sep, 16th, 2019**.

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

Duration of the Project: from **Oct. 10th, 2019** to **November 2020**.

Species / strain: **Pig (*Sus Domesticus*)** N° of animals:

Weight: **6 kg** Age: **21 days** Sex: **Male/Female** Source: **Setor de Suinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

Luciana Navajas Rennó

Coordenadora da CEUAP/UFV