

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EDILSON ANDRADE

MORFOLOGIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO INTESTINAL DE
LEITÕES LACTENTES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ÓLEOS
FUNCIONAIS

PONTA GROSSA

2021

EDILSON ANDRADE

MORFOLOGIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO INTESTINAL DE
LEITÕES LACTENTES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ÓLEOS
FUNCIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do título de
mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Área de Zootecnia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Losi Alves de
Almeida.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cheila Roberta Lehen.

PONTA GROSSA

2021

A553 Andrade, Edilson
 Morfologia e proliferação celular do epitélio intestinal de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais / Edilson Andrade. Ponta Grossa, 2021.
 56 f.

 Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida.

 Coorientadora: Profa. Dra. Cheila Roberta Lehnem.

 1. Fitogênicos. 2. Aleitamento. 3. Duodeno. 4. Células-tronco intestinais. I. Almeida, Fernanda Losi Alves de. II. Lehnem, Cheila Roberta. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. IV.T.

CDD: 636



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

EDILSON ANDRADE

“MORFOLOGIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO INTESTINAL DE LEITÕES LACTENTES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ÓLEOS FUNCIONAIS”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 31 de Março de 2021.

Profa. Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida – (UEPG)
Presidente

Profa. Dra. Cheila Roberta Lehnen (UEPG)
Membro Interno

Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali - (UEM)
Membro Externo

Profa. Dra. Valéria Rossetto Barriviera Furuya – (UEPG)
Suplente



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Aparecida Telles, Secretário(a)**, em 26/03/2021, às 10:42, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Losi Alves de Almeida, Professor(a)**, em 31/03/2021, às 13:35, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Cheila Roberta Lehnen, Professor(a)**, em 31/03/2021, às 13:35, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0446963** e o código CRC **943F1627**.

Dedico aos meus pais, Emílio Andrade e Dolores Fátima Andrade.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pois mesmo nos momentos mais difíceis e atípicos da jornada, me faz perceber que ainda há motivos para seguir buscando a melhoria.

Às minhas orientadoras Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida e Dra. Cheila Roberta Lehnen, por toda a atenção, dedicação, disponibilidade, apoio e por todos os ensinamentos durante todo esse processo.

Aos meus pais, Emílio e Dolores, que com muito amor sempre me apoiaram e auxiliaram para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Nelsi, Raquel e Nilson, pois juntos enfrentamos as dificuldades e nos tornamos mais fortes. Ao meu sobrinho Emílio Augusto, que me motiva a melhorar.

À Andressa, minha namorada e companheira de todas as horas, que com muito amor, compreensão e carinho me acompanha em todos os nossos desafios.

Aos meus amigos, pelos momentos compartilhados, pelas palavras de incentivo e por todo apoio ao longo da caminhada.

A todos os professores do programa de pós-graduação.

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores” (Sócrates).

RESUMO

Este estudo teve como objetivo explorar o uso de óleos funcionais (FO) de mamona e casca de caju em leitões durante o aleitamento, com ênfase na morfometria e proliferação celular intestinal. Foram utilizadas 40 porcas de diferentes ordens de parto. O período experimental foi de 28 dias (6 dias pré-parto e 21 dias de lactação). Após o parto, os leitões foram distribuídos nos tratamentos: NC: controle negativo, dieta comercial sem antibiótico para leitões e porcas; FOPig: dieta com FO para leitões; FOSow: dieta com FO para porcas; FOAll: dietas com FO para porcas e leitões; ANTPig: dieta com antibiótico (sulfametoxazol e trimetoprim) para leitões. Cortes histológicos do duodeno foram submetidos à coloração HE, para avaliação morfométrica, e à reação imunohistoquímica para PCNA (antígeno celular de proliferação nuclear) para contagem de células em proliferação nas criptas. A morfologia da parede do duodeno foi preservada em todos os tratamentos. No grupo NC, foram observados, com frequência, vasos congestionados na lâmina própria das vilosidades. A maior altura das vilosidades foi observada no duodeno de leitões que receberam dietas ANTPig, seguidos de leitões FOAll. Leitões NC, FOPig e FOSow apresentaram altura de vilosidades semelhantes, provavelmente devido ao menor efeito dos aditivos incluídos na dieta. Leitões ANTPig, seguidos dos FOAll, apresentaram maior profundidade de criptas em relação aos demais tratamentos. Na relação entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas não foram observadas diferenças entre os tratamentos. A área absortiva do duodeno foi semelhante nos leitões ANTPig e FOAll, porém maiores que nos demais tratamentos. A densidade de vilosidades foi menor no duodeno de leitões que não receberam antibióticos e nem óleos funcionais (NC) em relação ao tratamento FOAll. O número de células caliciformes foi superior em leitões NC e FOPig em relação aos leitões dos grupos FOAll e ANTPig. O número de células-tronco em divisão nas criptas foi menor nos tratamentos FOSow e FOAll em comparação com o tratamento ANTPig. Os FO promoveram alterações benéficas na mucosa intestinal, conforme observado no tratamento ANTPig, como aumento na altura das vilosidades, maior profundidade das criptas, maior área absortiva, maior densidade das vilosidades e menor número de células caliciformes quando comparado aos leitões NC, FOPig e FOSow. Nossos resultados sugerem que os FO de mamona e casca de caju podem ser uma alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento nos leitões lactentes, permitindo-lhes um melhor enfrentamento dos desafios a que estarão expostos na fase posterior ao desmame.

Palavras-chave: Fitogênicos. Aleitamento. Duodeno. Células-tronco intestinais.

ABSTRACT

This study aimed to explore the use of functional oils (FO) of castor and cashew peels in piglets during lactation, with an emphasis on morphometry and intestinal cell proliferation. Forty sows of different birth orders were used. The experimental period was 28 days (6 days pre-delivery and 21 days of lactation). After delivery, the piglets were distributed in the treatments: NC: negative control, commercial diet without antibiotics for piglets and sows; FOPig: diet with FO for piglets; FOSow: diet with FO for sows; FOAll: FO diets for sows and piglets; ANTPIG: antibiotic diet (sulfamethoxazole and trimethoprim) for piglets. Histological sections of the duodenum were stained with HE, for morphometric evaluation, and immunohistochemical reaction of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) for counting proliferating cells in the crypts. The morphology of the duodenum wall was preserved in all treatments. In the NC group, congested vessels were frequently observed in lamina propria of the villus. The highest villus height was observed in the duodenum of piglets that received ANTPIG diets, followed by FOAll piglets. NC, FOPig and FOSow piglets showed similar villus height, probably due to the lesser effect of the additives included in the diet. ANTPig piglets, followed by FOAll, showed greater depth of crypts compared to other treatments. In the relation between the height of the villi and the depth of the crypts, no differences were observed between the treatments. The absorptive area of the duodenum was similar in the piglets ANTPig and FOAll, but larger than in the other treatments. Villus density was lower in the duodenum of piglets that did not receive antibiotics or functional oils (NC) compared to the FOAll treatment. The number of goblet cells was higher in piglets NC and FOPig in relation to piglets in the groups FOAll and ANTPig. The number of stem cells dividing in the crypts was lower in the FOSow and FOAll treatments compared to the ANTPig treatment. The FO promoted beneficial changes in the intestinal mucosa, as observed in the ANTPig treatment, such as increased villus height, greater depth of the crypts, greater absorptive area, greater villus density and fewer goblet cells when compared to NC, FOPig and FOSow piglets. Our results suggest that the castor bean and cashew husks can be an alternative to the use of antibiotics as growth promoters in suckling piglets, allowing them to better face the challenges they will be exposed to in the post-weaning phase.

Keywords: Phytogetic. Suckling. Duodenum. Intestinal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, do duodeno de leitões alimentados com dietas contendo óleos funcionais. **A.** Parede do duodeno com suas túnicas mucosa (m), submucosa (sm), muscular externa (me) e adventícia (adv). A projeção formada pela mucosa e submucosa constitui uma prega. Barra: 500 μm . **B.** Detalhe de parte mucosa duodenal ilustrando uma vilosidade (v), projeção da lâmina própria (Lp) e do epitélio de revestimento (Ep). Esse epitélio evidencia enterócitos e células caliciformes (CC). Cr: criptas; mm: muscular da mucosa; Sm: submucosa; Me: muscular externa. Barra: 100 μm 17
- Figura 2: Esquema ilustrando a parede do intestino delgado formada pelas túnicas mucosa, submucosa, muscular externa e serosa. São observadas três vilosidades com sua irrigação sanguínea (à esquerda), circulação linfática (centro) e inervação (à direita). Células musculares lisas, ilustradas a direita, são responsáveis pela movimentação das vilosidades. Na submucosa e na muscular externa são encontrados os plexos submucoso e mioentérico, respectivamente. 20
- Figura 3: Ilustração em resumo das várias junções celulares encontradas nas células epiteliais do intestino delgado dos vertebrados, classificadas de acordo com sua função primária. Na porção mais apical da célula, a posição das junções é a mesma em praticamente todo o epitélio de vertebrados. As junções compactas ocupam a posição mais apical, seguidas pelas junções aderentes (cinturão de adesão), e então por uma linha paralela especial de desmossomos. Juntas, tais estruturas são denominadas complexo juncional. As junções do tipo fenda e os desmossomos adicionais são menos organizados. Dois tipos de junções de ancoragem célula-matriz prendem a superfície basal da célula à lâmina basal..... 25
- Figura 4: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, do duodeno de leitões alimentados com dietas contendo óleos funcionais. **A.** Parede do duodeno com suas túnicas mucosa (m), submucosa (sm), muscular externa (me) e adventícia (adv). A projeção formada pela mucosa e submucosa constitui uma prega. Barra: 500 μm . **B.** Detalhe de parte mucosa duodenal ilustrando uma vilosidade (v), projeção da lâmina própria (Lp) e do epitélio de revestimento (Ep). Esse epitélio evidencia enterócitos e células caliciformes (CC). Cr: criptas; mm: muscular da mucosa; Sm: submucosa; Me: muscular externa. Barra: 100 μm . **C.** Parte da parede do duodeno de leitão do tratamento NC. Observam-se vasos sanguíneos congestos na lâmina própria das vilosidades (v) e ao redor das criptas (cr). Sm: submucosa. Barra: 100 μm . **D.** Detalhe de uma vilosidade do duodeno de

leitão do tratamento NC. Vasos congestos (vc) na lâmina própria (Lp). Ep: epitélio de revestimento; cml: células musculares lisas. Barra: 50 μm	42
Figura 5: Equações de regressão entre a área absortiva (AA μm^2), altura de vilosidades (A vilos, μm) e largura de vilosidades (L vil, μm) do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais.	46
Figura 6: Equações de regressão entre a área absortiva (AA μm^2) e altura de vilosidades (A vilos, μm) com a relação entre altura de vilosidades e profundidade de criptas (AV:PC) do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais.	46
Figura 7: Fotomicrografia de cortes histológicos da mucosa do duodeno de leitão lactente alimentado com dieta contendo óleos funcionais. A. Corte histológico foi submetido à reação imunohistoquímica para detecção do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) para evidenciar células em proliferação (setas) nas criptas intestinais. Barra: 50 μm . B. Controle negativo da reação evidenciando a ausência de marcações inespecíficas. Barra: 50 μm	47
Figura 8: Proliferação celular avaliada pela contagem de células em proliferação (A) e células em proliferação por μm^2 (B) nas criptas da mucosa do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais. Barras representam média e desvio padrão (passaram pelo teste de normalidade de Anderson Darling). ^{abc} Letras diferentes no mesmo gráfico diferem pelo Teste de Tukey a 5% de significância.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros morfométricos avaliados no duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais. Altura de vilosidades (A vil, μm), largura de vilosidade (L vil, μm), profundidade de criptas (P cript, μm), relação altura de vilos: profundidade de cripta (AV:PC), área absorptiva (AA μm^2), densidade de vilos (DV, μm^2) e contagem de células caliciformes (CC, μm^2).....	44
Tabela 2: Estudo de correlações entre variáveis de morfometria do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTPig	Leitões com antibióticos na dieta.
FO	Óleo funcional.
FOAll	Leitões e porcas alimentados com óleos funcionais.
FOPig	Leitões alimentados com óleos funcionais na dieta.
FOSow	Porcas alimentadas com óleos funcionais na dieta.
ID	Intestino delgado.
NC	Tratamento controle (sem antibióticos e óleos funcionais).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 MORFOFISIOLOGIA DO INTESTINO DELGADO	15
1.1.1 Células Epiteliais Intestinais Diferenciadas	20
1.1.2 Células-tronco Intestinais	22
1.1.3 Barreira Epitelial Intestinal.....	24
1.2 EFICIÊNCIA INTESTINAL E SUA IMPORTÂNCIA PARA O CRESCIMENTO ANIMAL	25
1.2.1 Saúde Intestinal	26
1.2.2 Desmame	27
1.3 ÓLEO FUNCIONAIS	28
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2 – MORFOLOGIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO INTESTINAL DE LEITÕES LACTENTES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ÓLEOS FUNCIONAIS	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.2.1 Delineamento Experimental	38
2.2.2 Eutanásia e Coleta de Amostras	38
2.2.3 Análises Histológicas e Imunohistoquímica.....	39
2.2.4 Análises Estatísticas	40
2.3 RESULTADOS	41
2.4 DISCUSSÃO	48
2.5 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos como agentes promotores de crescimento (AGP), em animais de produção, tem sido praticado há mais de 50 anos (DIBNER; RICHARDS, 2005) e proporcionado aumento de produtividade (LEE et al., 2017). No entanto, nas últimas décadas, têm-se questionado a utilização de AGP devido, principalmente, à resistência bacteriana que pode ser alcançada por mutações no genoma ou por aquisição de genes que conferem resistência às bactérias (LÁZÁR et al., 2013). Como consequência desta preocupação e investigação, muitos países estão restringindo ou até proibindo o uso de AGP na produção animal (SEAL et al., 2018). Desde 2006, o uso de AGP foi proibido na União Europeia (BENGTSSON; WIERUP, 2006). Nos Estados Unidos e Canadá, foram impostas restrições ao seu uso em 2016 e 2017, respectivamente (OMONJO et al., 2018).

Em nível internacional, a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) aprovaram o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana em 2015. Entre os objetivos desse plano está o de reduzir o consumo de antibióticos em humanos e animais (HOELZER et al., 2017)

No Brasil, a Instrução Normativa nº 65, de 21 de novembro de 2006, alterada pela Instrução Normativa nº 14, de 15 de julho de 2016, regula o uso de medicamentos veterinários para animais de produção e proíbe o emprego de aditivos melhoradores de desempenho ou aditivos anticoccidianos com o mesmo princípio ativo do medicamento de uso veterinário (BRASIL, 2016a). O prazo para a implantação destas proibições foi prorrogado pela Instrução Normativa nº17, de 17 de julho de 2019, passando a ser válida após 18 de julho de 2020 (BRASIL, 2019).

A Instrução Normativa nº1, de 13 de janeiro de 2020, em seu artigo primeiro, proíbe em todo o território nacional o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana (BRASIL, 2020). O uso de sulfato de colistina foi proibido através da publicação da Instrução Normativa nº45, de 22 de novembro de 2016 (BRASIL, 2016b).

Devido a essas proibições, muitos compostos têm sido estudados como possíveis alternativas aos AGP. O uso de novos aditivos visa não somente melhorar o desempenho e preservar a saúde dos animais, mas também para garantir a segurança alimentar e proteger a saúde do consumidor (ZIMMERMANN et al., 2016).

Na suinocultura industrial os leitões são desmamados precocemente, antes que a

população microbiana estável seja estabelecida e o sistema imune intestinal esteja completamente maduro (FOUHSE; ZIJLSTRA; WILLING, 2016). Leitões desmamados sofrem uma mudança muito grande na dieta, saindo do leite com alto teor de gordura e baixo teor de carboidratos para uma alimentação com alto teor de carboidratos e baixo teor de gordura (YANG et al., 2016). Essas mudanças na dieta, causam uma redução drástica na atividades de enzimas como lactase, sacarase e maltase, na borda em escova, entre 3 e 5 dias após o desmame (BOUDRY et al., 2004; HEDEMANN; JENSEN, 2004). A mudança no ambiente social e físico a que os leitões são expostos, induz a uma diminuição significativa na ingestão de nutrientes nos primeiros dias após o desmame (YANG et al., 2016). O período de desmame dos leitões está associado ao estresse alimentar, ambiental e social, época de alta incidência de distúrbios intestinais como diarreia, queda no consumo de ração e perdas de desempenho e consequente diminuição de crescimento (BOUDRY et al., 2004).

A saúde intestinal de leitões está relacionado com a manutenção das estruturas e funções intestinais (PLUSKE; TURPIN; KIM, 2018), que influenciam na digestão e absorção eficazes dos alimentos, ausência de doenças gastrointestinais, microbioma intestinal normal e estável, estado imune efetivo e bem-estar animal (BISCHOFF, 2011).

Em leitões alimentados com dietas de FO, a capacidade antioxidante total é aumentada, enquanto a concentração de biomarcadores de estresse oxidativo são diminuídas (LONG et al., 2019). Os danos oxidativos afetam as proteínas de junção entre as células intestinais, resultando em aumento da permeabilidade às endotoxinas luminiais (ZUHL et al., 2014). A suplementação com FO alterou a morfologia intestinal em leitões e melhorou a digestibilidade de nutrientes (LONG et al., 2019).

Os fitoquímicos são um dos candidatos mais promissores para o uso como alternativas aos antibióticos via ração, devido às várias funções biológicas que possuem (XIONG et al., 2019). Durante a inflamação, as células secretam citocinas e quimiocinas inflamatórias, recrutando outras células para os locais das lesões, este é um processo necessário na resposta contra a infecção e no reparo do tecido, mas a inflamação, quando prolongada, pode levar a um gasto desnecessário de energia (HUANG; LEE, 2018).

Desta forma, o uso de óleos funcionais tem se mostrado uma boa opção para a substituição ao uso de antibióticos, pois possuem características que os tornam eficazes na eliminação de microrganismos patogênicos (ROZZA; PELLIZZON, 2013; TIIHONEN et al., 2010), modulação da microbiota intestinal (LI et al., 2018), diminuição da inflamação intestinal (HUANG; LEE, 2018), melhora na digestibilidade de nutrientes (LONG et al., 2019) e melhoria de ganho de peso em leitões (TAN et al., 2015).

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MORFOFISIOLOGIA DO INTESTINO DELGADO

Os animais possuem seu organismo formado, basicamente, por quatro tipos de tecidos: epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso. Essa classificação considera, principalmente, a morfologia e função das células, a quantidade e constituição da matriz extracelular e a origem embriológica desses tecidos. Esses tecidos associam-se de forma característica para formar os diferentes órgãos, o que resulta no seu funcionamento adequado e no do organismo como um todo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O tecido epitelial é formado por conjuntos de células contíguas com funções de revestimento e secreção. O tecido conjuntivo apresenta grande quantidade de matriz extracelular, produzida por suas próprias células, e desempenha funções variadas, como preenchimento, suporte, dependendo do tipo considerado. As células do tecido muscular são alongadas e possuem capacidade de contração. O tecido nervoso é composto por células com longos prolongamentos celulares, os neurônios, com funções especializadas de receber, gerar e transmitir impulsos nervosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O epitélio intestinal é constituído por uma monocamada de células epiteliais, que realizam funções primárias na digestão e absorção de nutrientes, e através do arranjo entre as células, formam uma barreira que impede o fluxo de patógenos luminiais e substâncias tóxicas (BLACHIER; WU; YIN, 2013). O tecido epitelial é formado por células poliédricas, justapostas e com pouca matriz extracelular. A justaposição é garantida pela firme adesão entre as células, devido à presença das junções intercelulares, permitindo a organização em camadas que revestem a superfície externa e as cavidades do corpo, podendo também se organizarem em glândulas especializadas na produção e liberação de diferentes tipos de secreções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). As células epiteliais são polarizadas e apresentam uma região basal, que está voltada para o tecido conjuntivo, e a porção apical, voltada para a superfície livre do epitélio (ALBERTS, 2017). A superfície de contato com células adjacentes é denominada superfície lateral e, quando considerada em conjunto com a superfície basal, utiliza-se a denominação superfície basolateral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). As células epiteliais sofrem renovação contínua, influenciados por processos altamente coordenados de proliferação celular, diferenciação e apoptose ao longo da cripta e da vilosidade intestinal (BLACHIER; WU; YIN, 2013).

O tecido epitelial encontra-se apoiado sobre o tecido conjuntivo. Esse tecido apresenta grande quantidade de matriz extracelular, produzida por suas próprias células. Entre o epitélio

e o tecido conjuntivo subjacente, há uma delgada camada acelular, medindo de 20 a 100 nm de espessura, chamada lâmina basal e que possui como seus principais constituintes o colágeno tipo IV, as glicoproteínas laminina e entactina e proteoglicanos. Uma das principais funções da lâmina basal é de promover a adesão das células epiteliais ao tecido conjuntivo subjacente. Através de fibrilas de ancoragem, constituídas por colágeno do tipo VII, a lâmina basal se prende ao tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Considerando que o tecido epitelial é desprovido de vasos sanguíneos, é através dos capilares sanguíneos, existentes no tecido conjuntivo, que o oxigênio e os nutrientes se difundem pela lâmina basal e alcançam as células epiteliais pelas suas superfícies basais e laterais. Nestas superfícies existem receptores acoplados a mensageiros químicos intracelulares que influenciam nas atividades da célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A digestão inicia na cavidade oral e continua no estômago e no intestino delgado (ID). Esse último representa o sítio terminal da digestão dos alimentos e nele ocorre a absorção dos nutrientes e secreção endócrina (GARTNER; HIATT, 2007). As células epiteliais, presentes nas vilosidades intestinais, desempenham papel fundamental na digestão e absorção de nutrientes luminiais (BLACHIER; WU; YIN, 2013).

O ID tem uma alta taxa de utilização de nutrientes através das vísceras drenadas pelo sistema porta, que incluem o estômago, intestinos, pâncreas e baço (WANG et al., 2018). Nos suínos, representa cerca de 5% do peso corporal e é responsável por 20-35% da síntese proteica e gasto energético de todo o corpo (WANG et al., 2018). Possui desenvolvimento acelerado nos primeiros dias de vida dos leitões, com a área de absorção podendo aumentar cerca de 50% no primeiro dia após o nascimento e 100% durante os primeiros 10 dias de vida (MARION; DIVIDICH, 2003).

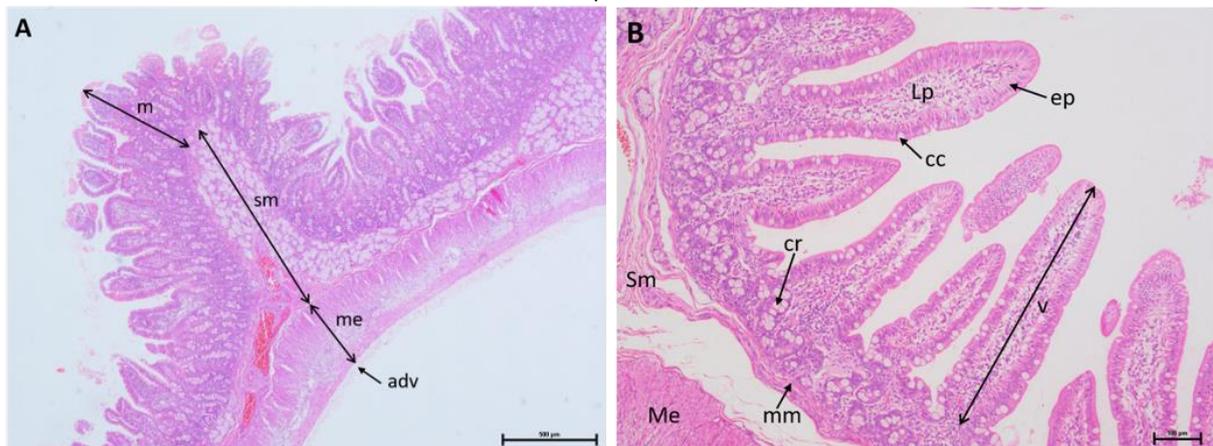
O ID possui três segmentos, sendo eles o duodeno, o jejuno e o íleo. Sua parede, assim como a do restante do tubo digestório, é formada por quatro camadas ou túnicas concêntricas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa ou adventícia (Figura 1A) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Na superfície interna do ID observam-se várias estruturas que aumentam a área de absorção de nutrientes: as pregas, as vilosidades (ou vilos), as microvilosidades (ou microvilos) e as criptas de Lieberkühn (GARTNER; HIATT, 2007).

As pregas são estruturas permanentes, de formato semilunar, circular ou espiral. São observadas a olho nu e representam dobras da mucosa e da submucosa (Figura 1A), sendo mais desenvolvidas no jejuno. As vilosidades são projeções microscópicas formadas pela lâmina própria recoberta pelo epitélio de revestimento. O eixo central de cada vilosidade

contém alças capilares, um canal linfático, que termina em fundo cego, e algumas células musculares lisas rodeadas por um tecido conjuntivo frouxo rico em células de defesa. As microvilosidades são especializações da membrana plasmática apical da célula epitelial de revestimento das vilosidades intestinais e só podem ser observadas na microscopia eletrônica. Esses três tipos de projeções aumentam cerca de 600 vezes a área absorptiva do ID. O epitélio de revestimento invagina em direção à lâmina própria, formando as glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn, que também aumentam a área de superfície do ID (Figura 1B) (GARTNER; HIATT, 2007).

Figura 1: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, do duodeno de leitões alimentados com dietas contendo óleos funcionais. **A.** Parede do duodeno com suas túnicas mucosa (m), submucosa (sm), muscular externa (me) e adventícia (adv). A projeção formada pela mucosa e submucosa constitui uma prega. Barra: 500 μ m. **B.** Detalhe de parte mucosa duodenal ilustrando uma vilosidade (v), projeção da lâmina própria (Lp) e do epitélio de revestimento (Ep). Esse epitélio evidencia enterócitos e células caliciformes (CC). Cr: criptas; mm: muscular da mucosa; Sm: submucosa; Me: muscular externa. Barra: 100 μ m.



Fonte: O autor.

Considerando as túnicas do ID, a mucosa é a mais interna, em contato com a luz do órgão, e é constituída pelo epitélio de revestimento simples cilíndrico, uma lâmina própria subjacente e a muscular da mucosa. O epitélio de revestimento recobre as vilosidades e a superfície entre elas e é constituído, principalmente, pelos enterócitos e pelas células caliciformes. Esse epitélio é contínuo contínuo com o epitélio das criptas, formado por enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth e células-tronco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A lâmina própria, composta por tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e fibras musculares lisas, preenche o centro das vilosidades intestinais, onde as células musculares lisas são responsáveis pela movimentação rítmica, auxiliando na absorção dos nutrientes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Seguindo do lúmen em direção à camada muscular da mucosa, a lâmina própria é comprimida pelas

numerosas criptas, reduzindo-se a finas lâminas de tecido conjuntivo frouxo com grande vascularização (GARTNER; HIATT, 2007).

A muscular da mucosa é constituída por duas camadas de células musculares lisas, a camada circular interna e a longitudinal externa. As fibras musculares da camada circular interna estão presentes no eixo das vilosidades e durante a digestão estas fibras musculares se contraem ritmicamente, encurtando a vilosidade repetidas vezes por minuto (GARTNER; HIATT, 2007).

Abaixo da mucosa, situa-se a túnica submucosa, com grande suprimento vascular e linfático. É constituída por tecido conjuntivo fibroelástico, sendo mais fibroso que o tecido conjuntivo da lâmina própria. As glândulas duodenais, também chamadas de glândulas de Brunner, são específicas de mamíferos e estão presentes ao longo da submucosa do duodeno de herbívoros, restrita ao duodeno proximal em carnívoros e distribuído da parte proximal à média do duodeno em onívoros (TERAOKA et al., 2001). As glândulas de Brunner produzem um fluido mucoso, rico em bicarbonato (GARTNER; HIATT, 2007). Esse muco alcalino, com pH 8,1 a 9,3, confere proteção aos efeitos da acidez do suco gástrico na mucosa duodenal, neutraliza o pH do quimo, aproximando-o ao pH ótimo para a ação das enzimas pancreáticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Essas glândulas também secretam urogastrona que inibe a produção de ácido clorídrico pelo estômago e amplifica a velocidade de atividade mitótica das células epiteliais (GARTNER; HIATT, 2007).

A lâmina própria e a submucosa do intestino delgado são ricas em células linfóides, apresentando agregados de nódulos linfóides (GALT: tecido linfóide associado ao tubo digestório), que são mais numerosos no íleo e, neste órgão, são conhecidos como placas de Peyer (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A função primária de defesa contra potenciais patógenos que possam entrar através de epitélios de superfície vulneráveis é executada pelo sistema imunológico da mucosa. Como função secundária, o sistema imune intestinal tem a capacidade de discriminar entre antígenos associados a patógenos e comensais, expressando respostas ativas contra os primeiros e tolerância aos últimos (BLACHIER; WU; YIN, 2013).

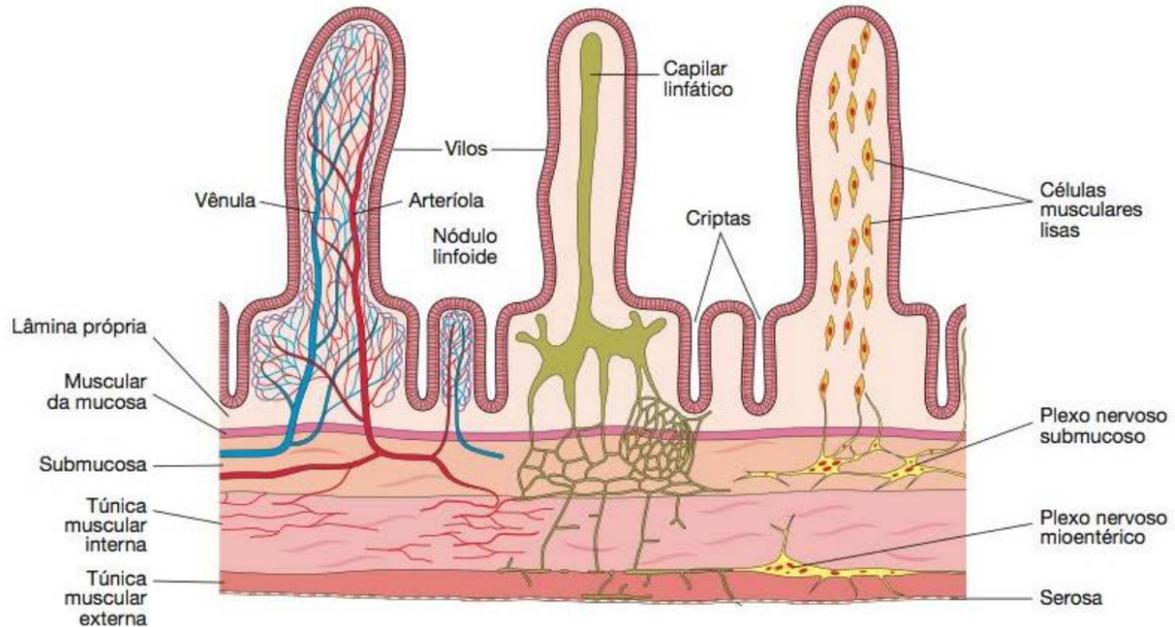
Abaixo da submucosa, localiza-se a túnica muscular do ID. Ela apresenta duas camadas de fibras musculares lisas com orientações diferentes entre elas. A camada circular interna é composta por fibras musculares lisas dispostas em arranjo circunferencial, responsáveis pelo estreitamento e alargamento intestinal, enquanto a camada longitudinal externa apresenta arranjo paralelo ao eixo do tubo intestinal, responsável pelo alongamento e encurtamento intestinal. Juntas, as contração destas fibras musculares são responsáveis pelo peristaltismo do órgão (GARTNER; HIATT, 2007).

A superfície externa do intestino delgado apresenta uma camada de tecido conjuntivo que nos dois terços finais do duodeno é a camada adventícia e no restante do intestino delgado é a serosa (GARTNER; HIATT, 2007).

A inervação do tubo digestório é realizada por dois componentes, um intrínseco, que compreende o sistema nervoso entérico (SNE), e um extrínseco, representado pelo sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático. O SNE é autossuficiente, mas sofre modulação pelo SNA. Está presente em toda a extensão do tubo digestório, controlando suas funções secretoras e motoras. É constituído por uma sequência de numerosos gânglios localizados na submucosa, formando o plexo submucoso (de Meissner), e entre as duas subcamadas de músculo liso da muscular externa, representado pelo plexo mioentérico (de Auerbach). O plexo submucoso controla a função secretora e a movimentação da mucosa, enquanto o plexo mioentérico controla os movimentos peristálticos (GARTNER; HIATT, 2007).

Esses plexos recebem estímulos dos neurônios sensoriais, através de terminações nervosas próximas da camada epitelial e na camada de músculo liso, tendo os quimiorreceptores relação com a composição do conteúdo intestinal e os mecanorreceptores com o grau de expansão da parede intestinal. Esta inervação intrínseca é responsável pelas contrações intestinais que ocorrem de maneira independente da inervação extrínseca. A inervação extrínseca é formada por fibras nervosas colinérgicas parassimpáticas que estimulam a atividade da musculatura lisa intestinal e também por fibras nervosas adrenérgicas simpáticas que deprimem a atividade da musculatura lisa intestinal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; ORIÁ et al., 2016).

Figura 2: Esquema ilustrando a parede do intestino delgado formada pelas túnicas mucosa, submucosa, muscular externa e serosa. São observadas três vilosidades com sua irrigação sanguínea (à esquerda), circulação linfática (centro) e inervação (à direita). Células musculares lisas, ilustradas a direita, são responsáveis pela movimentação das vilosidades. Na submucosa e na muscular externa são encontrados os plexos submucoso e mioentérico, respectivamente.



Fonte: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. . **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2017.

1.1.1 Células Epiteliais Intestinais Diferenciadas

São quatro os principais tipos de células diferenciadas encontradas no epitélio intestinal: enterócito, com função absorptiva, e células calciformes, de Paneth e enteroendócrina com finalidade secretora.

As células do epitélio de revestimento intestinal, se caracterizam por derivar do endoderma do embrião e ser continuamente substituídas por um processo denominado renovação celular, que ocorre em um período médio de 4 a 5 dias (ALBERTS et al., 2017; QI; CHEN, 2015), com exceção das células de Paneth, que sobrevivem por até 57 dias (IRELAND et al., 2005).

Os enterócitos desempenham papéis-chave na digestão e absorção dos nutrientes presentes no lúmen (WANG et al., 2018) e constituem até 90% da população de células epiteliais no eixo cripta-vilosidade (CHENG; LEBLOND, 1974). São células colunares, com núcleo oval situado em sua porção basal. No ápice da célula, a membrana plasmática possui pequenas projeções para o lúmen, chamadas de microvilosidades. Estima-se que cada célula absorptiva tenha em média três mil microvilosidades, sendo que em cada milímetro quadrado de mucosa contenha aproximadamente de 200 milhões dessas estruturas (ALBERTS, 2017;

GARTNER; HIATT, 2007). Internalizar moléculas nutrientes produzidas durante a digestão é a função mais importante dos enterócitos. Enzimas como as dissacaridases e dipeptidases são produzidas pelos enterócitos e podem fazer parte do glicocálice nas microvilosidades. Dissacarídeos e dipeptídios são hidrolisados em monossacarídeos e aminoácidos, podendo então ser absorvidos por meio de transporte ativo. A ação conjunta da lipase pancreática e bile é responsável pela digestão lipídica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O epitélio intestinal apresenta células especializadas na produção e secreção de muco, denominadas células caliciformes. Elas produzem glicoproteínas ácidas do tipo mucina que, após serem hidratadas e formarem ligações cruzadas entre si, darão origem ao muco intestinal (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Esse muco cobre o epitélio com uma camada que protege as células intestinais de contaminação e da abrasão com o conteúdo intestinal (STANGE, 2013; ALBERTS et al., 2017). Essas células são fundamentais para a manutenção da homeostase e integridade do epitélio intestinal. A diminuição na produção de muco e a perda de células caliciformes estão intimamente relacionadas com doenças entéricas em suínos (JUNG; SAIF, 2017; MCCAULEY; GUASCH, 2015).

As células caliciformes possuem grânulos de secreção que preenchem a sua região apical, sendo que o núcleo fica normalmente situado na região basal, rica em retículo endoplasmático rugoso. O complexo de Golgi é muito desenvolvido, indicativo de seu importante papel nesta célula. As proteínas são sintetizadas na porção basal da célula e ao serem transportadas para o retículo endoplasmático e complexo de Golgi, as enzimas glicosiltransferase acrescentam monossacarídeos às proteínas. No momento em que ocorre a secreção pela célula, a substância se torna altamente hidratada e forma o muco, um gel viscoso, elástico e lubrificante (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Esse muco protege a extensa superfície mucosa do trato gastrointestinal que é frequentemente exposta a microrganismos potencialmente invasivos.

As células de Paneth são células que fazem parte do sistema imune inato, secretam criptidinas que são proteínas da família das defensinas, substâncias com ação antibacteriana, antifúngica e antiviral (ALBERTS et al., 2017). Apresentam o complexo de Golgi bem desenvolvido, grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocôndrias e grandes grânulos de secreção apicais contendo um produto de secreção homogêneo (GARTNER; HIATT, 2007). A lisozima, presente no interior dos grânulos deste tipo celular, possui capacidade de digerir a parede de algumas bactérias, contribuindo no controle da microbiota intestinal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Ainda entre as quatro principais células diferenciadas do epitélio intestinal, estão as células enteroendócrinas, apresentando mais de 15 subtipos diferentes, responsáveis pela secreção de serotonina e hormônios peptídicos que atuam sobre neurônios e outros tipos celulares na parede do intestino, regulando o crescimento, proliferação e as atividades digestivas das células intestinais e de outros tecidos (STANGE, 2013; ALBERTS et al., 2017). Por exocitose, liberam seus grânulos de secreção e, então, os hormônios podem exercer efeitos parácrinos ou endócrinos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Células secretoras de polipeptídios do trato gastrintestinal podem ser classificadas em tipo aberto, quando a parte apical da célula apresenta microvilosidades em contato com o lúmen do órgão, e tipo fechado, quando a parte apical da célula está recoberta por outras células epiteliais. Células do tipo aberto são mais alongadas que as células absorptivas adjacentes, suas microvilosidades podem conter receptores para substâncias presentes no lúmen intestinal, influenciando nas funções de secreção celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Os antígenos que entram pelo intestino são destinados aos órgãos linfoides periféricos associados aos intestinos, como as placas de Peyer (ALBERTS, 2017). Neste processo, um grupo celular importante são as células M, células epiteliais especializadas que recobrem nódulos linfoides das placas de Peyer, localizadas no íleo, e são responsáveis pelo transporte de antígenos do lúmen para as células do sistema imunológico (STANGE, 2013). Caracterizam-se pela presença de numerosas invaginações basais contendo muitos linfócitos e células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos. Atuam na captação de antígenos por endocitose e transporte para macrófagos e células linfoides adjacentes, as quais migram então para outros compartimentos do sistema linfóide. Nos nódulos linfoides, as respostas imunológicas contra os antígenos apresentados são iniciadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

1.1.2 Células-tronco Intestinais

Intercaladas entre as células de Paneth, logo acima da base da cripta, encontram-se as células-tronco ou regenerativas, encarregadas de abastecer os níveis mais altos da cripta com algumas de suas descendentes destinadas à diferenciação, enquanto outras células de sua progênie permanecerão na base da cripta para que se mantenha contínuo o processo de renovação celular. Células comprometidas com a diferenciação, chamadas de células precursoras comprometidas ou células amplificadoras em trânsito, são derivadas das células-tronco e se dividem logo acima das mesmas, diferenciando em duas linhagens celulares principais: enterócitos e células secretoras de muco e hormônios (ALBERTS, 2017; MERAN;

BAULIES; LI, 2017). As células de Paneth são o único tipo de célula conhecido a migrar em direção à base da cripta, onde desempenham a importante função de regulação na proliferação e diferenciação de células-tronco, além de serem responsáveis pela secreção de peptídeos antimicrobianos (CLEVERS; BEVINS, 2013), conforme descrito anteriormente.

A substituição celular contínua, que ocorre no epitélio intestinal, é mantida pelas células tronco intestinais localizadas em seu nicho na base da cripta (MERAN; BAULIES; LI, 2017). Essas células-tronco se multiplicam por mitose, durante a qual uma célula se divide em duas, recebendo cada nova célula um jogo cromossômico igual ao da célula original. Esse processo consiste na duplicação prévia dos cromossomos e sua distribuição equitativa para as células-filhas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O processo de renovação envolve a proliferação rápida e contínua de células epiteliais na base da cripta, com posterior migração dessas células ao longo do eixo da cripta-vilosidade (UMAR, 2010). Para o número de células-tronco em uma cripta se manter estável, cada divisão deve produzir uma célula-filha que permanece como uma célula-tronco e uma que se torna comprometida com a diferenciação (ALBERTS, 2017). Uma vez que elas chegam nas vilosidades, elas estão totalmente diferenciadas e prontas para executar as suas funções (STANGE, 2013). A cripta, por abrigar as células-tronco e progenitores iniciais, é considerada como o compartimento de proliferação, enquanto a vilosidade compreende o compartimento de diferenciação por ser composta de múltiplas linhagens diferenciadas (QI; CHEN, 2015).

A proliferação de células epiteliais intestinais ocorre de forma muito ativa, sendo essa renovação coordenada por um pequeno número de células-tronco, formadas por duas populações: as células-tronco de reserva, também chamadas de células +4, que apresentam um ciclo celular quiescente ou lento, em condições homeostáticas, e as células-tronco em proliferação ativa, também conhecidas como células CBC, sendo estas as principais contribuintes para a renovação das células epiteliais (VERDILE et al., 2019).

O revestimento do intestino se renova mais rapidamente do que qualquer outro no corpo de um mamífero (ALBERTS, 2017), esse processo parece ser inteiramente dependente de um número limitado de células progenitoras multipotentes de longa duração (UMAR, 2010). A auto renovação rápida se faz necessária para compensar o dano constante infligido às células intestinais pelas agressões causadas pelo conteúdo intestinal (STANGE, 2013).

O fluxo continuado de células que emergem das criptas tem que ser equilibrado pela apoptose de células diferenciadas nas pontas das vilosidades, de onde elas caem no lúmen do intestino (STANGE, 2013). A proliferação, diferenciação e apoptose de células epiteliais

intestinais possuem funções importantes na manutenção do desenvolvimento intestinal e recuperação do dano tecidual (BARSZCZ; SKOMIAŁ, 2010).

1.1.3 Barreira Epitelial Intestinal

O intestino possui uma grande área de superfície com múltiplas funções, sendo uma das principais a absorção de nutrientes. Outra tarefa importante para o intestino é manter uma barreira local que impeça a passagem de bactérias, toxinas, antígenos e patógenos, contidas no lúmen intestinal, para outros locais do organismo. A barreira epitelial intestinal é a primeira linha de defesa contra um ambiente hostil no lúmen intestinal (CAO et al., 2018). É dependente da permeabilidade da membrana plasmática e das junções intercelulares dos enterócitos (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005).

Ao longo da superfície lateral dos enterócitos, as junções intercelulares estão dispostas em uma sequência constante do ápice em direção à base da célula: zônulas de oclusão ou estreitas, zônulas de adesão ou de ancoragem, desmossomos e junções comunicantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). O conjunto formado pelas zônulas de oclusão, zônulas de adesão e desmossomos forma o complexo unitivo que mantém os enterócitos vizinhos firmemente unidos entre si (GARTNER; HIATT, 2007).

A barreira epitelial intestinal é formada, principalmente, pelas zônulas de oclusão estabelecidas entre enterócitos vizinhos (LI; AKHTAR; CHOUDHRY, 2012). As referidas junções são formadas por proteínas, como claudinas e ocludinas, constituindo uma barreira seletivamente permeável para o transporte paracelular de pequenas moléculas e íons através do epitélio intestinal (LI et al., 2012; ALBERTS et al., 2017). As zônulas de oclusão estão localizadas na região próxima à superfície apical dos enterócitos, formando uma junção que envolve toda a circunferência das células (GARTNER; HIATT, 2007).

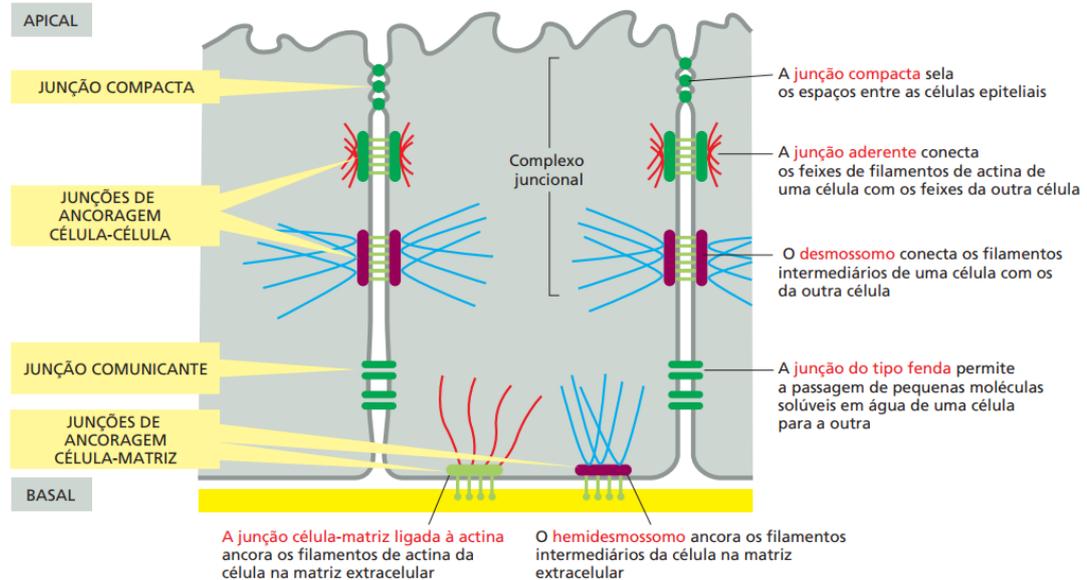
As zônulas de adesão formam um complexo juncional, logo abaixo das zônulas de oclusão, que também envolve todo perímetro apical da célula (GARTNER; HIATT, 2007). Tanto as zônulas de adesão como os desmossomos são formados ao redor das proteínas transmembrana que pertencem à família das caderinas. As proteínas da superfamília das caderinas da membrana plasmática de uma célula se ligam diretamente a outras moléculas de caderinas na membrana plasmática da célula vizinha (ALBERTS et al., 2017).

As junções comunicantes, ou junções do tipo fenda, criam passagens através de conjuntos de conéxons que comunicam os citoplasmas adjacentes, possibilitando que moléculas de sinalização, íons e alguns hormônios possam transitar através destas junções,

tornando possível a comunicação entre as células para que, assim, trabalhem de forma coordenada (ALBERTS et al., 2017).

A manutenção da integridade da barreira epitelial e intestinal (Figura 3) é crucial para a homeostasia intestinal e do organismo como um todo, pois o seu comprometimento está frequentemente associado a doenças gastrintestinais e sistêmicas (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005). Patógenos frequentemente exercem efeitos gastrintestinais, com o enfraquecimento das junções entre as células, permitindo a translocação desses patógenos e a ativação de sinais inflamatórios ou o estabelecimento de lesões inflamatórias locais (KENNY et al., 2011).

Figura 3: Ilustração em resumo das várias junções celulares encontradas nas células epiteliais do intestino delgado dos vertebrados, classificadas de acordo com sua função primária. Na porção mais apical da célula, a posição das junções é a mesma em praticamente todo o epitélio de vertebrados. As junções compactas ocupam a posição mais apical, seguidas pelas junções aderentes (cinturão de adesão), e então por uma linha paralela especial de desmossomos. Juntas, tais estruturas são denominadas complexo juncional. As junções do tipo fenda e os desmossomos adicionais são menos organizados. Dois tipos de junções de ancoragem célula-matriz prendem a superfície basal da célula à lâmina basal.



Fonte: ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

1.2 EFICIÊNCIA INTESTINAL E SUA IMPORTÂNCIA PARA O CRESCIMENTO ANIMAL

O maior entendimento sobre aditivos, que possam ser usados na alimentação animal e que consigam alcançar os objetivos de produzir alimentos seguros para o consumo humano, tem sido uma constante busca no meio da pesquisa. A preocupação crescente com o uso de antibióticos na produção animal e seu efeito sobre a saúde humana, através de uma possível alteração na qualidade dos produtos derivados animais, incentivou a proibições de seu uso em

vários países (XU et al., 2018). Como alternativa, dentro deste conceito, os óleos funcionais têm sido explorados para manter o desempenho dos leitões sem o uso de antibióticos.

Leitões possuem alta susceptibilidade a patógenos bacterianos, estresse oxidativo e inflamação, levando à redução no desempenho do crescimento, altas taxas de mortalidade, morbidade e comprometimento do bem-estar animal (OMONIJO et al., 2018).

1.2.1 Saúde Intestinal

O termo saúde intestinal pode ser descrito como a homeostase no trato gastrointestinal (TGI), no que está relacionado a sua estrutura e função, por meio da interação entre a microbiota e o hospedeiro, a integridade da barreira epitelial e a funcionalidade do sistema imune da mucosa (PLUSKE; TURPIN; KIM, 2018).

Alguns fatores são fundamentais para a manutenção da saúde intestinal, tais como digestão e absorção eficazes dos alimentos, ausência de doenças gastrointestinais, microbioma intestinal normal e estável, estado imune efetivo e bem-estar (BISCHOFF, 2011). Entretanto, a saúde intestinal pode ser comprometida não somente quando há manifestação de doenças, podendo também ser relacionada com o baixo consumo de ração após o desmame, que acarreta na ausência de nutrientes no lúmen, além do estresse e outros desafios associados a esse desmame, que causam alterações nas funções e estruturas do TGI (CELI et al., 2017).

O TGI desempenha papel importante na regulação das funções imunológicas do indivíduo, sendo essenciais para o funcionamento biológico e homeostase de todas as funções do corpo do animal (PLUSKE; TURPIN; KIM, 2018). As funções absorptivas e protetoras do intestino delgado são dependentes da integridade do seu epitélio (UMAR, 2010). A microbiota intestinal desempenha um papel importante na regulação do metabolismo e na maturação da imunidade desse órgão (LIANG; WU; JIN, 2018). Em humanos e outros animais, a microbiota é vasta e diversificada e apresenta, aproximadamente, 100 trilhões de microrganismos (LI et al., 2018). A relação do intestino com esses microrganismos é dinâmica e sensível a inúmeros fatores ambientais, em especial à dieta (OMONIJO et al., 2018). Sob condições estressantes, o sistema imunológico é suprimido, levando à inflamação crônica do intestino delgado (PLUSKE; TURPIN; KIM, 2018).

A fase que antecede o parto e os primeiros dias de vida dos leitões representa um período crucial durante o qual muitos sistemas se desenvolvem, como o sistema imune intestinal e a microbiota comensal (BOURGOT et al., 2014). O estabelecimento da microbiota intestinal desempenha um papel crucial na proliferação e maturação do tecido linfóide associado à mucosa do intestino (GALT), bem como no recrutamento de células de defesa

plasmáticas e células T secretoras de imunoglobulinas A (IgA) para os locais das mucosas (BOURGOT et al., 2014). Os sinais derivados da microbiota influenciam a comunicação entre as células epiteliais e as células dendríticas do intestino, modulando, assim, a natureza e a intensidade das respostas das células B e T intestinais (BOURGOT et al., 2014). Bactérias comensais são importantes na regulação da homeostase lipídica sistêmica e alterações nos níveis desses metabólitos podem influenciar na função imune (BRESTOFF; ARTIS, 2013). Estas bactérias são necessárias para a produção de ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta, ambos apresentando propriedades anti-inflamatórias. Além disso, atuam como fontes de vitaminas e aminoácidos em nível intestinal (BRESTOFF; ARTIS, 2013).

Os leitões possuem alta susceptibilidade a patógenos bacterianos, estresse oxidativo e inflamação, fatores que resultam em redução no desempenho do crescimento, comprometendo o bem-estar animal e aumentando as taxas de morbidade e mortalidade das doenças (OMONJO et al., 2018).

1.2.2 Desmame

Objetivando o alcance das metas de produção na indústria suína, os leitões são desmamados precocemente, antes que uma população microbiana estável seja estabelecida e o sistema imunológico esteja completamente maduro (FOUHSE; ZIJLSTRA; WILLING, 2016). O desmame é um procedimento estressante para os leitões. O estresse social ocasionado pela formação de novos grupos e a adaptação ao consumo de um novo alimento, geralmente uma dieta sólida, podem gerar resistência à alimentação (BLAVI; MALLO; PÉREZ, 2018), contribuindo para a diminuição do desempenho (WEI et al., 2017). Distúrbios no ecossistema microbiano do intestino, durante a criação de suínos, podem aumentar drasticamente o risco de doenças (FOUHSE; ZIJLSTRA; WILLING, 2016). Isso torna o desmame o período mais crítico do ciclo de produção de suínos, pois é acompanhado por múltiplos estressores que induzem anorexia transitória, inflamação intestinal e desequilíbrio da microbiota intestinal (VERDILE et al., 2019).

A transição do desmame para a dieta sólida também está associada a um aumento da permeabilidade intestinal, que favorece o cruzamento de toxinas e patógenos pelo epitélio (BROWN et al., 2006; WANG et al., 2016). O estresse não causa somente mudanças estruturais e funcionais, como também contribui para uma reação inflamatória, que pode comprometer a arquitetura das vilosidades e criptas intestinais e proporcionar um ambiente favorável ao crescimento de algumas classes de bactérias, resultando na perda da diversidade microbiana (CAMILLERI et al., 2012; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). Wang et al.

(2016), relataram que o desmame precoce induziu a uma diminuição na proporção da altura das vilosidades e profundidade das criptas no jejuno e íleo. Outros estudos demonstraram que a atividade específica das enzimas da borda em escova dos enterócitos diminuíram para valores mínimos no período de 4 a 5 dias após o desmame, juntamente com a redução na altura das vilosidades e o aumento da profundidade da cripta (FAN et al., 2002; TANG et al., 1997). Foi demonstrado que o estresse do desmame induziu à interrupção do ciclo celular, à apoptose acelerada e inibição da proliferação celular (ZHU et al., 2014).

O desenvolvimento e maturidade funcional dos enterócitos é importante em leitões, para que possam atingir sua capacidade digestiva e de absorção máxima (MARION; DIVIDICH, 2003). Antibióticos promotores de crescimento (AGP) têm sido amplamente utilizados em dietas para suínos, especialmente em dietas pós desmame, para controlar a incidência de diarreia e melhorar o desempenho do crescimento (OMONIJO et al., 2018).

1.3 ÓLEO FUNCIONAIS

Todas as plantas têm a capacidade de produzir compostos voláteis, mesmo em pequenas quantidades. Aproximadamente 10% das espécies vegetais conseguem sintetizar, secretar e armazenar, no citoplasma de células secretoras, uma pequena quantidade de essência odorífera (SOCACI et al., 2020). Os óleos funcionais (FO), classe de moléculas aromáticas voláteis, são descritos entre os principais tipos de extratos vegetais naturais (LI et al., 2018). Possuem potenciais antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e características que os tornam repulsivos para insetos e alguns herbívoros (ROZZA; PELLIZZON, 2013; TIIHONEN et al., 2010). São extraídos de flores, folhas, caules, raízes, sementes ou frutos das plantas por destilação a vapor, extrusão ou extração com solvente (BRENES; ROURA, 2010).

Em relação à atividade e efeitos biológicos, cada constituinte químico tem suas propriedades características (LI et al., 2018). Os FO de mamona e casca de caju são alternativas ao uso de antimicrobianos. A molécula farmacológica presente na mamona é o ácido ricinoleico (MURAKAMI; EYNG; TORRENT, 2014). O composto derivado de glicina e ácido ricinoleico mostrou excelentes atividades antimicrobianas e anti-biofilme contra as cepas bacterianas gram positivas (MOHINI et al., 2017), pró e anti-inflamatória (VIEIRA et al., 2001). A casca de caju contém alquil fenóis, composto principalmente por ácido anacardico, cardol e metil cardol, possuindo atividade antimicrobiana (KUBO; NIHEI; TSUJIMOTO, 2003)

A diversidade e complexidade da composição dos FO dificulta a identificação de todos os constituintes e a atribuição de suas atividades biológicas a um determinado composto

(BRENES; ROURA, 2010; DHIFI et al., 2016; NAZZARO; FRATIANNI; MARTINO, 2013).

FO são líquidos lipofílicos viscosos dotados de odor característico das plantas aromáticas, com alta variabilidade em sua composição, tanto em termos qualitativos como quantitativos, influenciado por fatores ambientais e genéticos como cultivo, estágio vegetativo, época de colheita, região cultivada, porção da planta utilizada e método de extração (BRENES; ROURA, 2010; SOCACI et al., 2020).

FO apresentam características de melhoria da digestibilidade de nutrientes, podendo ser relacionada com as alterações histológicas que ocorrem no intestino de animais suplementados (LI et al., 2012), mas seus efeitos fisiológicos que resultam nestas melhorias, devem ser melhor estudados (ZHAI et al., 2018).

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BARSZCZ, M.; SKOMIAŁ, J. The development of the small intestine of piglets - chosen aspects. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 20, n. 1, p. 3–15, 2010.
- BENGTSSON, B.; WIERUP, M. Antimicrobial resistance in scandinavia after ban of antimicrobial growth promoters. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 147–156, 2006.
- BISCHOFF, S. C. “Gut health”: A new objective in medicine? **BMC Medicine**, v. 9, 2011.
- BLACHIER, F.; WU, G.; YIN, Y. **Nutritional and Physiological Functions of Trans-Fatty Acids**. Paris: Springer, 2013.
- BLAVI, L.; MALLO, J. J.; PÉREZ, J. F. Anethol, cinnamaldehyde, and eugenol inclusion in feed affects postweaning performance and feeding behavior of piglets 1. **Journal of Animal Science**, n. April, p. 5262–5271, 2018.
- BOUDRY, G. et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 9, p. 2256–62, 2004.
- BOURGOT, C. LE et al. Maternal short-chain fructooligosaccharide supplementation influences intestinal immune system maturation in piglets. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–12, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020**. Proibir, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana, na forma desta Instrução Normativa e dá outras providências. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385#:~:text=1%C2%BA%20Proibir%2C%20em%20todo%20territo%C3%B3rio,na%20forma%20desta%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa>. Acesso em: 19 dez. 2020
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 14, de 15 de julho de 2016**. Altera os Anexos I, II e III da Instrução Normativa SDA nº 65, de 21 de novembro de 2006 e dá outras providências. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia//assetpublisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/21770499/do1-2016-07-18-instrucao-normativa-n-14-de-15-de-julho-de-2016-21770368>. Acesso em: 19 dez. 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17, de 17 de julho de 2019**. Prorroga o prazo estabelecido no Art. 4º da Instrução Normativa nº 14, de 15 de julho de 2016, até 18 de julho de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-17-de-17-de-julho-de-2019-197104494>. Acesso em: 19 dez. 2020
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016**. Proíbe, em todo o território nacional, a importação e a

fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, na forma desta Instrução Normativa e dá outras providências. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/do1-2016-11-30-instrucao-normativa-n-45-de-22-de-novembro-de-2016-22078259. Acesso em: 19 dez. 2020

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1–2, p. 1–14, 2010.

BRESTOFF, J. R.; ARTIS, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 676–684, 2013.

BROWN, D. C. et al. The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 3–4, p. 187–198, 2006.

CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, n. 6, p. 503–512, 2012.

CAO, S. T. et al. Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 1073–1083, 2018.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B.. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005.

CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88–100, 2017.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **American Journal of Anatomy**, v. 141, n. 4, p. 537–561, 1974.

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. **Annu. Rev. Physiol**, 2013.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action Actual Usage of Antimicrobials in Denmark Voluntary and Legislated Bans. **Poultry Science**, v. 84, p. 634–643, 2005.

FAN, M. Z. et al. Postnatal ontogeny of kinetics of porcine jejunal brush border membrane-bound alkaline phosphatase, aminopeptidase N and sucrase activities. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 599–607, 2002.

FOUHSE, J. M.; ZIJLSTRA, R. T.; WILLING, B. P. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 30–36, 2016.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Rio de Janeiro:

Elsevier Health Sciences Brazil, 2007.

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

HOELZER, K. et al. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–38, 2017.

HUANG, C. M.; LEE, T. T. Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 5, p. 617–627, 2018.

IRELAND, H. et al. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 4, p. 1332–1336, 2005.

JUNG, K.; SAIF, L. J. Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. **Research in Veterinary Science**, v. 110, p. 12–15, 2017.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. . **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2017.

KENNY, M. et al. Probiotics-do they have a role in the pig industry? **Animal**, v. 5, n. 3, p. 462–470, 2011.

KUBO, I.; NIHEI, K. I.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial Action of Anacardic Acids against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7624–7628, 2003.

LÁZÁR, V. et al. Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 700, 2013.

LEE, J. Y. et al. Prohibition of antibiotic growth promoters has affected the genomic profiles of Lactobacillus salivarius inhabiting the swine intestine. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2017.

LI, P. et al. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 11, p. 1617–1626, 2012.

LI, X.; AKHTAR, S.; CHOUDHRY, M. A. Alteration in intestine tight junction protein phosphorylation and apoptosis is associated with increase in IL-18 levels following alcohol intoxication and burn injury. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 2, p. 196–203, 2012.

LI, Y. et al. Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–13, 2018.

LIANG, S.; WU, X.; JIN, F. Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the

Microbiota–Gut–Brain Axis. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 12, 2018.

LONG, S. et al. Effects of Forsythia Suspense Extract as an Antibiotics Substitute on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Serum Antioxidant Capacity, Fecal Escherichia coli Concentration and Intestinal Morphology of Weaned Piglets. **Animals**, v. 9, p. 729, 2019.

MARION, J.; DIVIDICH, J. LE. Nutrient – Gene Interactions Weaning and Feed Intake Alter Pancreatic Enzyme Activities and Corresponding mRNA Levels in 7-d-Old Piglets. **American Society for Nutritional Sciences**, n. August, p. 362–368, 2003.

MCCAULEY, H. A.; GUASCH, G. Three cheers for the goblet cell: Maintaining homeostasis in mucosal epithelia. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 8, p. 492–503, 2015.

MERAN, L.; BAULIES, A.; LI, V. S. W. Review Article Intestinal Stem Cell Niche : The Extracellular Matrix and Cellular Components. **Stem Cells International**, p. 1–11, 2017.

MOHINI, Y. et al. Synthesis and biological evaluation of ricinoleic acid-based lipoamino acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 21, p. 5198–5202, 2017.

MURAKAMI, A. E.; EYNG, C.; TORRENT, J. Effects of functional oils on coccidiosis and apparent metabolizable energy in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 7, p. 981–989, 2014.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. DE. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, p. 1451–1474, 2013.

OMONJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 126–136, 2018.

ORIÁ, R. B. et al. **Sistema digestório: Integração básico-clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

PLUSKE, J. R.; TURPIN, D. L.; KIM, J. C. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 187–196, 2018.

QI, Z.; CHEN, Y. G. Regulation of intestinal stem cell fate specification. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 6, p. 570–578, 2015.

ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: A review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 51–63, 2013.

SEAL, B. S. et al. Microbial-derived products as potential new antimicrobials. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 1–12, 2018.

SOCACI, S. A.; FĂRCAȘ, A. C.; TOFANĂ, M. Functional ingredients derived from aromatic plants. **Feed Additives**, p. 133–146, 2020.

STANGE, D. E. Intestinal Stem Cells. **Digestive Diseases**, v. 31, n. 3–4, p. 293–298, 2013.

TAN, C. et al. Effects of Dietary Supplementation of Oregano Essential Oil to Sows on Oxidative Stress Status , Lactation Feed Intake of Sows , and Piglet Performance. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

- TANG, M. et al. Effect of Segregated Early Weaning on Postweaning Small Intestinal Development in Pigs 1. **J. Anim. Sci.**, p. 3191–3200, 1997.
- TERAOKA, H. et al. Ca²⁺ signaling in porcine duodenal glands by muscarinic receptor activation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 4 43-4, p. 729–737, 2001.
- TIIHONEN, K. et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British Poultry Science**, v. 51, n. 3, p. 381–392, 2010.
- UMAR, S. Intestinal Stem Cells. **Digestive Diseases**, v. 12, n. 3–4, p. 340–348, 2010.
- VERDILE, N. et al. Evolution of pig intestinal stem cells from birth to weaning. **Animal**, v. 13, n. 12, p. 2830–2839, 2019.
- VIEIRA, C. et al. Pro- and anti-inflammatory actions of ricinoleic acid: Similarities and differences with capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 364, n. 2, p. 87–95, 2001.
- WANG, J. et al. Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning periods. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2016.
- WANG, Q. et al. Suckling Piglet Intestinal Enterocyte Nutrient Metabolism Changes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 410081, n. 86, p. 2103–2113, 2018.
- WEI, H. K. et al. A carvacrol-thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v. 11, n. 2, p. 193–201, 2017.
- XIONG, X. et al. Nutritional Intervention for the Intestinal Development and Health of Weaned Pigs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. February, p. 1–14, 2019.
- XU, Y. T. et al. Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 110–119, 2018.
- YANG, H. et al. Effects of weaning on intestinal crypt epithelial cells in piglets. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–11, 2016.
- ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017.
- ZHAI, H. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, 2018.
- ZHU, L. H. et al. Gene expression profiling analysis reveals weaning-induced cell cycle arrest and apoptosis in the small intestine of pigs. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 3, p. 996–1006, 2014.
- ZUHL, M. et al. Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. **British Journal of Sports Medicine**, v. 48, n. 12, p. 980–986, 2014.

ZIMMERMANN, J. A. et al. Effects of probiotics in swines growth performance: A meta-analysis of randomised controlled trials. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 280–293, 2016.

CAPÍTULO 2 – MORFOLOGIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO INTESTINAL DE LEITÕES LACTENTES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ÓLEOS FUNCIONAIS

2.1 INTRODUÇÃO

Objetivando o alcance das metas de produção na indústria suína, os leitões são desmamados precocemente, antes que uma população microbiana estável seja estabelecida no intestino delgado e o sistema imunológico esteja completamente maduro (FOUHSE; ZIJLSTRA; WILLING, 2016). A transição do desmame para a dieta sólida está associada a mudanças estruturais e funcionais no intestino delgado, como aumento da permeabilidade de modo a favorecer o cruzamento de toxinas e patógenos pelo epitélio (BROWN et al., 2006; WANG et al., 2016).

O estresse causado pelo desmame pode resultar em reação inflamatória que compromete a arquitetura das vilosidades e criptas intestinais e proporciona um ambiente favorável ao crescimento de algumas classes de bactérias, com perda da diversidade microbiana local (CAMILLERI et al., 2012; ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). Yang et al. (2016) mostraram que o desmame também afeta a proliferação das células-tronco das criptas, resultando em efeitos negativos, como a diarreia.

Os antibióticos promotores de crescimento (AGP) têm sido utilizados em dietas pós-desmame para suínos para controlar a incidência de diarreia e melhorar o desempenho do crescimento (OMONIJO et al., 2018). No entanto, nas últimas décadas, têm-se questionado a utilização dos AGP devido, principalmente, à resistência bacteriana que pode ser alcançada por mutações no genoma ou por aquisição de genes que conferem resistência às bactérias (LÁZÁR et al., 2013). Como consequência desta preocupação, muitos países têm restringido ou até proibido o uso de AGP na produção animal (SEAL et al., 2018).

Com vistas à melhoria da segurança alimentar humana, alternativas para a redução no uso de aditivos em rações para animais de produção estão sendo o foco de muitas pesquisas. Dentre os compostos utilizados para a substituição ao uso de AGP, os óleos funcionais (FO) têm atraído bastante atenção, pois se apresentam como uma alternativa para uso na ração (ZENG et al., 2015a). Os FO promovem atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e melhora na morfologia e função da barreira intestinal (CHENG et al., 2017; GIANNENAS et al., 2014). A ausência de resistência bacteriana descrita aos FO é considerada uma das principais vantagens destes compostos em relação aos antimicrobianos (KNEZEVIC et al., 2016).

A característica lipofílica dos FO permite que eles se incorporem aos lipídeos da membrana celular das bactérias, tornando a estrutura mais permeável e possibilitando a passagem de compostos inespecíficos, culminando no extravasamento de íons e outras moléculas celulares podendo levar à perda de viabilidade ou mesmo à morte bacteriana (DHIFI et al., 2016; GOUVEA; ROSENTHAL; HELENA, 2017).

Geralmente as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis à ação dos FO devido às características na estrutura da sua parede celular. Bactérias gram-negativas são mais complexas, pois possuem uma membrana externa adicional que diminui a permeabilidade às moléculas hidrofóbicas, sendo que pequenas moléculas hidrofílicas podem entrar na célula através de abundantes proteínas porinas (DIAO et al., 2014; NAZZARO; FRATIANNI; MARTINO, 2013; ZHANG et al., 2016).

Estudos têm mostrado que os FO podem melhorar a resistência às infecções em suínos e aves (ZENG et al., 2015b), reduzir a conversão alimentar e diminuir a incidência de diarreia em leitões (LI et al., 2018). Além disso, A utilização dos FO em suínos tem mostrado melhora no desempenho (CHO et al., 2006; KROISMAYR et al., 2008), na digestibilidade dos nutrientes (YAN et al., 2010), no status imune e no ecossistema intestinal (MANZANILLA et al., 2004).

Considerando a morfologia intestinal, alguns estudos têm mostrado relação entre a utilização dos FO e alterações benéficas em parâmetros morfométricos do intestino delgado, como altura das vilosidades, profundidade das criptas intestinais (LI et al., 2012) e estímulo na produção de muco intestinal (WINDISCH et al., 2008). O aumento na altura das vilosidades, por exemplo, melhora a digestibilidade de nutrientes e o ganho de peso em leitões (XU et al., 2017). A produção de muco intestinal contribui para a proteção do epitélio contra contaminação bacteriana, por meio da inibição da aderência à mucosa (WINDISCH et al., 2008).

Devido à ausência de trabalhos que explorem em nível celular o impacto da administração de FO em suínos e considerando a grande influência que o desenvolvimento celular e a saúde intestinal possuem para um bom ganho de peso e melhoria da conversão alimentar em animais de produção, o objetivo desse estudo foi de explorar o uso de FO de mamona e casca de caju em leitões durante o aleitamento, com ênfase na morfometria e proliferação celular intestinal. De forma específica, objetivamos avaliar a morfometria de vilosidades e criptas, a contagem de células calciformes presentes nas vilosidades e a contagem de células em proliferação nas criptas do duodeno de leitões lactentes alimentados com OF de mamona e casca de caju.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Delineamento Experimental

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Processo CEUA 023/2018). O experimento foi realizado na Unidade Produtora de Leitões em Carambeí, Paraná. Foram utilizadas 40 porcas pré-selecionadas de genética comercial, inseminadas artificialmente, de diferentes ordens de parto (variação de 1 a 7). O período experimental foi de 28 dias (6 dias pré-parto e 21 dias de lactação). As porcas foram alojadas em celas de parição, equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros automáticos em ambiente termo neutro. Após o nascimento, os leitões permaneceram sobre piso de aquecimento com temperatura ajustável de acordo com o conforto térmico recomendado pela fase.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com cinco tratamentos. NC (controle negativo): dieta comercial sem antibiótico para leitões e porcas; FOPig: dieta com óleos funcionais (FO) para leitões; FOSow: dieta com FO para porcas; FOAll: dietas FO para porcas e leitões; ANTPIG: dieta com antibiótico (sulfametoxazol e trimetoprim) para leitões. Foi considerado como fator de bloqueamento a ordem de parto (OP), distribuída em bloco 1 - OP 1 (primíparas); bloco 2 - OP 2 a 7 partos (pluríparas). Cada tratamento teve dois blocos e um total de oito repetições, sendo considerada uma repetição a porca e sua leitegada. As porcas lactantes receberam dietas isonutritivas e formuladas segundo as exigências nutricionais do NRC (2012) alimentadas *ad libitum*. A partir dos dez dias de vida, os leitões receberam as dietas experimentais. As dietas contendo uma mistura de OF de mamona e casca de caju, receberam inclusão de 1,5 kg do produto comercial.

2.2.2 Eutanásia e Coleta de Amostras

Ao fim do experimento, 20 leitões (selecionados aleatoriamente dos tratamentos e do grupo controle) foram eutanasiados utilizando anestesia com 40mg/kg de ketamina associada a 20mg/kg de xilazina, via intramuscular e, após atingimento de anestesia profunda, aplicação de 10mL de cloreto de potássio 20% via intravenosa. Para as análises histológicas e imunohistoquímica, de cada animal foi coletado um segmento do duodeno (Hu et al, 2013). As amostras de duodeno foram cuidadosamente lavadas em solução fisiológica, abertas, com auxílio de tesoura cirúrgica, ao longo do seu eixo longitudinal, tendo suas bordas fixadas em placas de isopor. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10%

durante 24 horas e, em seguida, embebidas em álcool 70% até o seu processamento histológico.

2.2.3 Análises Histológicas e Imunohistoquímica

Para avaliar a morfologia intestinal, morfometria das vilosidades e criptas e realizar a contagem de células caliciformes e das células em proliferação no epitélio do duodeno, as amostras embebidas em álcool 70% foram desidratadas em soluções de álcoois de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo automático (Leica RM 2145) para obtenção de cortes longitudinais (5 μm) que foram submetidos à coloração hematoxilina e eosina (HE) ou à reação imunohistoquímica.

As imagens dos cortes histológicos corados em HE ou submetidos à reação imunohistoquímica foram obtidas em microscópio óptico (Olympus BX 50), acoplado à câmera de alta resolução (Olympus PMC 35 B), utilizando as objetivas de 20X e 40X, respectivamente.

Nos cortes histológicos corados em HE foram determinadas, na mucosa duodenal, a altura e largura das vilosidades (μm), a profundidade das criptas (μm), a relação altura de vilos/profundidade das criptas, área absorptiva (μm^2), densidade de vilos (μm^2) e contagem de células caliciformes (número de células por mm^2). Foram avaliadas todas as vilosidades íntegras, criptas em corte longitudinal e realizada a contagem de todas as células caliciformes, por imagem, totalizando uma média de 18 campos por animal e 4 animais por tratamento, com auxílio do programa Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).

As medidas das vilosidades foram tomadas a partir da região basal que coincide com a porção superior das criptas percorrendo-a longitudinalmente até seu ápice. As criptas foram medidas da sua base até a região de transição cripta/vilosidade. Na análise morfométrica, em cada lâmina foi realizada a média e o desvio padrão da altura (μm) das vilosidades e profundidade (μm) das criptas correspondentes. A medida da densidade dos vilos (μm^2) foi realizada com base na razão entre o número de vilosidades íntegras e a área total do campo observado. A área absorptiva foi determinada a partir da seguinte equação: Altura de vilo x Largura de vilo. A densidade de vilos por área foi calculada através da multiplicação de uma área total de $3.500 \times 3.500 \mu\text{m}^2$ pelo total de vilos contados em $3.500 \mu\text{m}^2$, sendo assim, foi determinado o total de vilos numa área de $12.500 \mu\text{m}^2$, sendo o total de vilos corrigidos para área de $10.000 \mu\text{m}^2$. As estimativas de área absorptiva e densidade de vilos seguiram as proposições de Silva (2016).

Para avaliar as células em proliferação no epitélio intestinal, cortes histológicos foram submetidos à reação imunohistoquímica para o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), utilizando-se os reagentes do kit *Histostain[®]-Plus Kits Invitrogen[®] 2nd Generation LAB-SA Detection System* (Invitrogen). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em séries decrescentes de álcool e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (10mM, pH 6,0) a 95°C durante 20 minutos, seguida de duas lavagens em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio 30% em metanol (1:9 v/v) por 20 minutos, seguido de três lavagens de PBS (Tampão fosfato salina 0,05 M, pH 7,4) por cinco minutos.

Os cortes foram incubados em solução de bloqueio (solução A), disponível no *kit*, por 30 minutos, seguida da incubação com o anticorpo primário anti-PCNA a 1:500 em *overnight* a 4 °C e lavagem em PBS por quatro vezes de cinco minutos cada. Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (reagente B), disponível no *kit*, por 30 minutos, seguida de lavagem em PBS por quatro vezes de cinco minutos.

As lâminas foram incubadas com o reagente C do *kit*, contendo a enzima conjugada, por 10 minutos, seguida de lavagem em PBS por duas vezes de cinco minutos. Para visualizar os núcleos marcados, os cortes foram incubados com solução contendo o cromógeno DAB (3-3' diaminobenzina tetrahydrochloride) de cinco a dez minutos, seguida de três lavagens de um minuto em água destilada e montagem em *Permount*. Para confirmar a especificidade da marcação de cada proteína, foi utilizado um controle negativo da reação, substituindo-se o anticorpo primário por solução de PBS.

Para cada reação, foi realizada a contagem dos núcleos PCNA-positivos, utilizando-se uma média de 24 campos escolhidos aleatoriamente na lâmina histológica de cada animal, no aumento de 40X, sendo que foram avaliados 3 animais em cada tratamento. Para essa contagem, foi utilizado um sistema de análise de imagens (*Image Pro-Plus* versão 4.5). Os resultados foram expressos como número de células em proliferação marcadas por mm². O processamento histológico das amostras e as análises microscópicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

2.2.4 Análises Estatísticas

Os dados observados foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento GLM (General Linear Model) no programa estatístico Minitab 19 (Minitab Inc., State College, USA). As eventuais diferenças entre as médias entre os tratamentos foram

comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). A normalidade dos erros foi testada pelo teste de Anderson-Darling.

2.3 RESULTADOS

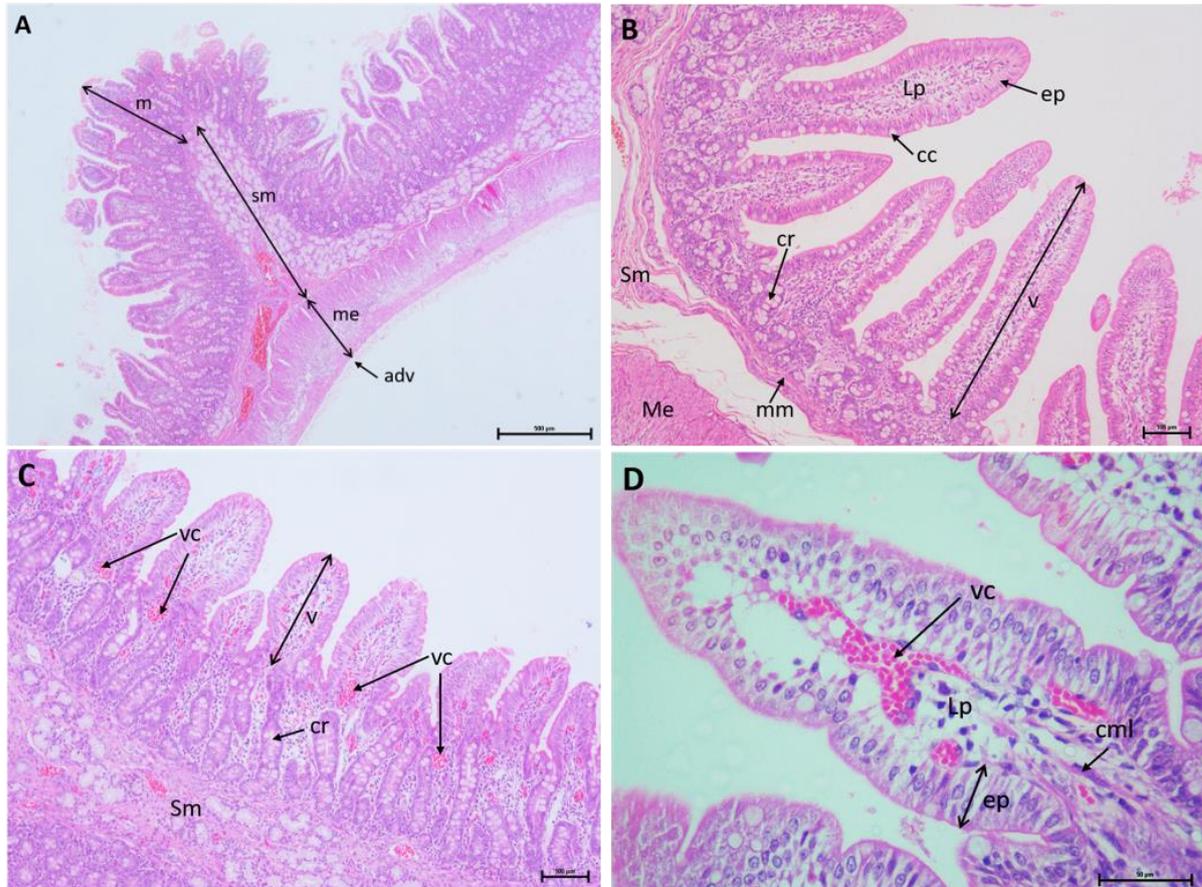
A análise morfológica dos cortes histológicos de duodeno de leitões mostrou preservação da organização das túnicas mucosa, submucosa, muscular externa e adventícia, independentemente do tratamento (Figura 4A). Na mucosa intestinal, foram observadas vilosidades íntegras, de aspecto digitiforme, revestidas pelo epitélio simples cilíndrico com células caliciformes. Na lâmina própria das vilosidades, o tecido conjuntivo frouxo mostrou células de defesa, como linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos, além de células musculares lisas. Ainda na lâmina própria, evidenciaram-se as criptas intestinais de formato tubular quando seccionadas longitudinalmente. A região inferior da mucosa mostrou-se delimitada pela muscular da mucosa, constituída por tecido muscular liso disposto em algumas poucas camadas (Figura 4B).

No tratamento NC, a lâmina própria das vilosidades frequentemente apresentou vasos sanguíneos congestos contendo hemácias no seu interior. Esses vasos também foram observados na lâmina própria ao redor das criptas (Figura 4C e D). A observação desses vasos foi menos frequente nos tratamentos FOPIg, FOSow e FoAll. No tratamento ANTPig, a hiperemia foi rara.

A submucosa duodenal, constituída por tecido conjuntivo moderadamente denso não-modelado, apresentou glândulas túbulo-acinosas mucosas. Nessa túnica, foram observados o plexo submucoso e grandes vasos sanguíneos e linfáticos, independente do tratamento.

A muscular externa, composta por tecido muscular liso, apresentou duas subcamadas, a circular interna e a longitudinal externa, entre as quais foram observados gânglios do plexo mioentérico. Externamente à muscula externa, foi evidenciada uma adventícia constituída por tecido conjuntivo frouxo.

Figura 4: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, do duodeno de leitões alimentados com dietas contendo óleos funcionais. **A.** Parede do duodeno com suas túnicas mucosa (m), submucosa (sm), muscular externa (me) e adventícia (adv). A projeção formada pela mucosa e submucosa constitui uma prega. Barra: 500 μ m. **B.** Detalhe de parte mucosa duodenal ilustrando uma vilosidade (v), projeção da lâmina própria (Lp) e do epitélio de revestimento (Ep). Esse epitélio evidencia enterócitos e células caliciformes (CC). Cr: criptas; mm: muscular da mucosa; Sm: submucosa; Me: muscular externa. Barra: 100 μ m. **C.** Parte da parede do duodeno de leitão do tratamento NC. Observam-se vasos sanguíneos congestionados na lâmina própria das vilosidades (v) e ao redor das criptas (cr). Sm: submucosa. Barra: 100 μ m. **D.** Detalhe de uma vilosidade do duodeno de leitão do tratamento NC. Vasos congestionados (vc) na lâmina própria (Lp). Ep: epitélio de revestimento; cml: células musculares lisas. Barra: 50 μ m.



Fonte: O autor.

Os resultados referentes à análise morfométrica dos cortes histológicos do duodeno de leitões estão representados na Tabela 1. A maior altura das vilosidades foi observada no duodeno de leitões que receberam dietas ANTPIG seguidos de leitões FOAll. Leitões NC, FOPIg e FOSow apresentaram alturas de vilosidades semelhantes. Já a largura das vilosidades foi maior nos leitões FOAll em relação ao tratamento ANTPig. Os leitões ANTPig apresentaram maior profundidade de criptas em relação aos demais tratamentos. A relação entre a altura das vilosidades e profundidade das criptas (AV:PC) não mostrou diferença entre os tratamentos. Já a área absorptiva foi semelhante nos leitões ANTPig e FOAll, porém maiores que os demais tratamentos. A densidade de vilosidades foi inferior no duodeno de leitões que não receberam antibióticos e nem óleos funcionais (NC). Já o número de células

caliciformes foi superior em leitões NC, FOPig e FOSow em relação a leitões do grupo FOAll e ANTPig.

Tabela 1: Parâmetros morfométricos avaliados no duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais. Altura de vilosidades (A vil, μm), largura de vilosidade (L vil, μm), profundidade de criptas (P crip, μm), relação altura de vilos: profundidade de cripta (AV:PC), área absorptiva (AA μm^2), densidade de vilos (DV, μm^2) e contagem de células caliciformes (CC, μm^2).

Tratamentos	N	Variáveis						
		A vil, μm	L vil, μm	P crip, μm	AV:PC	AA, μm^2	DV, μm^2	CC, μm^2
NC	250	243,9 \pm 4,82 ^{bc}	108,6 \pm 1,87 ^{ab}	160,5 \pm 2,17 ^c	1,60 \pm 0,04	26.622 \pm 730 ^c	30,93 \pm 1,06 ^b	90 ^a
FO ^{Pig}	253	227,8 \pm 4,85 ^c	101,3 \pm 1,56 ^b	147,3 \pm 1,89 ^c	1,61 \pm 0,04	23.008 \pm 585 ^b	35,62 \pm 1,21 ^{ab}	89 ^a
FO ^{Sow}	115	229,7 \pm 7,60 ^c	106,6 \pm 2,65 ^{ab}	158,2 \pm 2,84 ^c	1,50 \pm 0,06	23.531 \pm 776 ^{bc}	31,20 \pm 1,67 ^{ab}	88 ^{ab}
FO ^{All}	289	260,7 \pm 6,32 ^b	114,3 \pm 1,33 ^a	172,9 \pm 2,15 ^b	1,57 \pm 0,04	29.588 \pm 782 ^a	37,18 \pm 1,31 ^a	76 ^b
ANT ^{Pig}	206	286,8 \pm 7,19 ^a	108,0 \pm 3,45 ^b	207,0 \pm 4,21 ^a	1,50 \pm 0,05	30.561 \pm 982 ^a	36,23 \pm 1,46 ^{ab}	75 ^b
dpr ¹		91,1	25,9	39,0	0,659	11.700	19,3	2,4
p ²		***	***	***	ns	***	*	***

N, tamanho da amostra; \pm erro padrão da média, ¹Dpr, desvio padrão residual; ²Probabilidade: * (P<0,05); ** (P<0,01); *** (P<0,001); ^{Ns} (P>0,05); ^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste de Tukey a 5% de significância. NC: controle negativo, dieta comercial sem antibiótico para leitões e porcas; FO^{Pig}: dieta com óleos funcionais (FO) para leitões; FO^{Sow}: dieta com FO para porcas; FO^{All}: dietas FO para porcas e leitões; ANT^{PIG}: dieta com antibiótico para leitões.

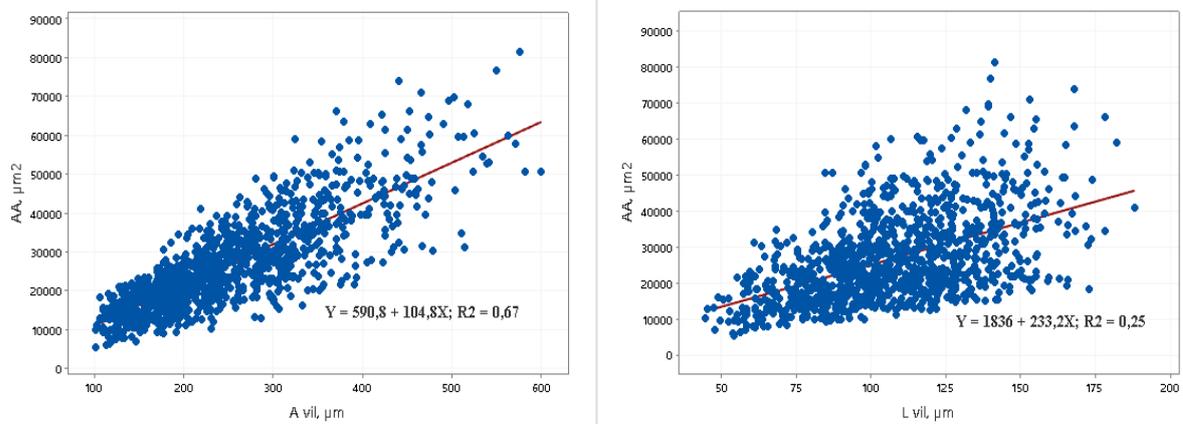
A análise de correlação entre as variáveis morfológicas do duodeno dos leitões está ilustrada na Tabela 2. A relação AV:PC possui alta correlação com a altura dos vilos (0,816; $P < 0,001$), e mediana com a profundidade de criptas (0,466; $P < 0,001$). Estas relações são verificadas na Tabela 2, onde identificamos através da correlação de Pearson o comportamento geral das amostras (1192 amostras). A alta correlação entre relação AV:PC e as variáveis altura de vilosidades e profundidade de criptas ocorre devido ao uso das mesmas como base do cálculo. A densidade de vilos apresenta correlação positiva com a profundidade das criptas (0,146; $P < 0,001$). Esta relação está associada ao processo de crescimento das vilosidades na base das criptas, assim como as células caliciformes possuem correlação negativa com a altura dos vilos (-0,257; $P < 0,001$). A densidade de vilos e o número de células caliciformes possuem correlação moderada estando relacionadas a contagem das células caliciformes dentro das vilosidades. O efeito dos óleos funcionais não pode ser quantificado dentro do estudo de correlações devido ao caráter qualitativo e de comparação entre os grupos avaliados.

Tabela 2: Estudo de correlações entre variáveis de morfometria do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais

	A vil, μm	L vil, μm	P crip, μm	AV:PC	AA, μm^2	DV, μm^2
A vil, μm						
L vil, μm	-0,039 ^{ns}					
P crip, μm	0,056*	-0,004 ^{ns}				
AV:PC	0,816***	-0,044 ^{ns}	-0,466***			
AA, μm^2	0,815***	0,512***	0,039 ^{ns}	0,661***		
DV, μm^2	-0,064*	-0,138***	0,146***	-0,118**	-0,139**	
CC, μm^2	-0,257**	0,150 ^{ns}	-0,104 ^{ns}	-0,141 ^{ns}	-0,102 ^{ns}	0,415*

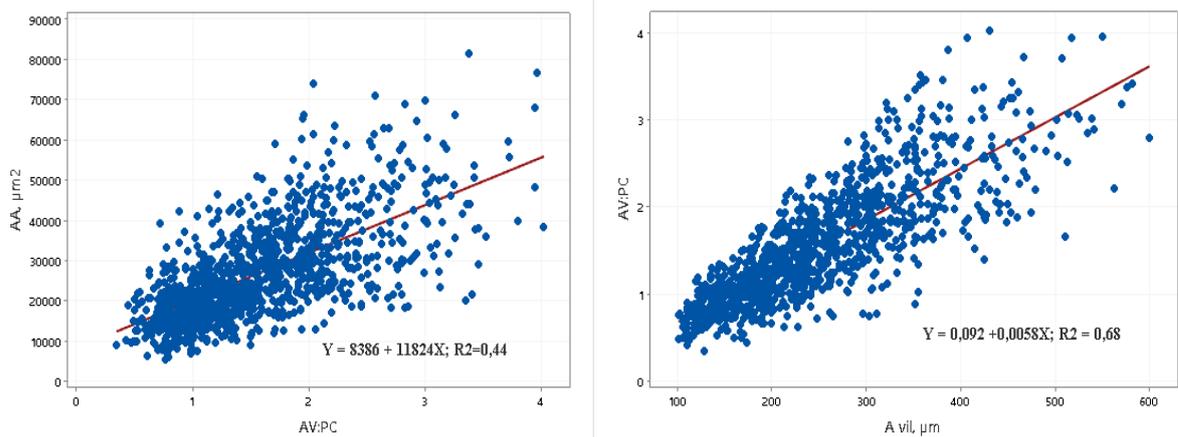
Altura de vilosidades (A vil, μm), largura de vilosidades (L vil, μm), profundidade de criptas (P crip, μm), relação altura de vilos: profundidade de cripta (AV:PC), área absorptiva (AA μm^2), densidade de vilos (DV, μm^2), contagem de células caliciformes (CC, μm^2). Correlação de Pearson, Probabilidade: * ($P < 0,05$); ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$); ^{ns} ($P > 0,05$).

Figura 5: Equações de regressão entre a área absorptiva (AA μm^2), altura de vilosidades (A vilos, μm) e largura de vilosidades (L vil, μm) do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais.



Fonte: O autor.

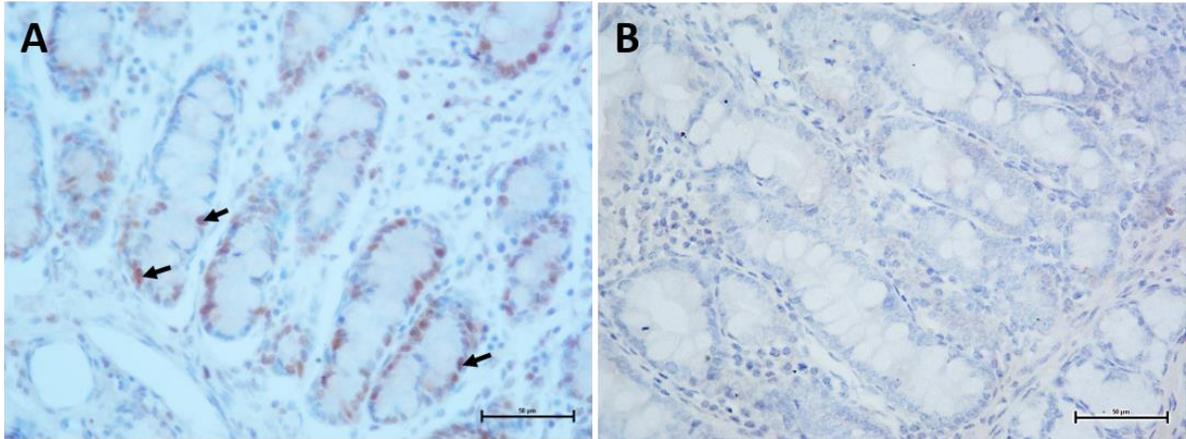
Figura 6: Equações de regressão entre a área absorptiva (AA μm^2) e altura de vilosidades (A vilos, μm) com a relação entre altura de vilosidades e profundidade de criptas (AV:PC) do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais.



Fonte: O autor.

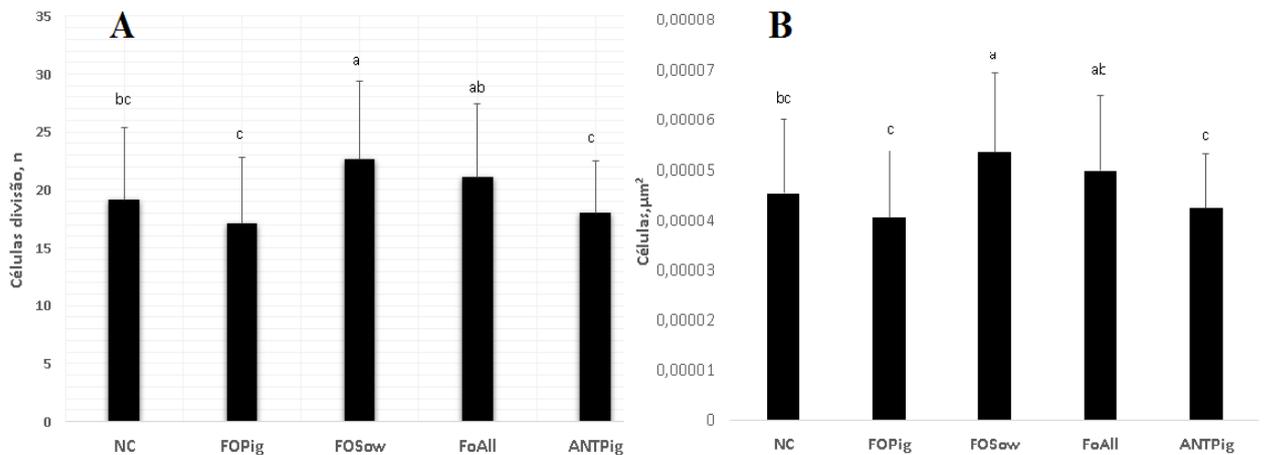
A reação imunohistoquímica para o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) permitiu identificar células em proliferação nas criptas do duodeno em todos tratamentos. Em todos esses locais, a marcação foi localizada especificamente no núcleo (Figura 7). A contagem das células-tronco em divisão, localizadas nas criptas intestinais (Figura 8A e B), indicou que os grupos FOSow e FOAll obtiveram os maiores índices de células em proliferação por μm^2 no duodeno de leitões lactentes. O número de células em proliferação por μm^2 no duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais (Figura 8A) seguiu as mesmas médias de desvio padrão da contagem de células tronco em divisão (Figura 8B).

Figura 7: Fotomicrografia de cortes histológicos da mucosa do duodeno de leitão lactente alimentado com dieta contendo óleos funcionais. **A.** Corte histológico foi submetido à reação imunohistoquímica para detecção do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) para evidenciar células em proliferação (setas) nas criptas intestinais. Barra: 50 μm . **B.** Controle negativo da reação evidenciando a ausência de marcações inespecíficas. Barra: 50 μm .



Fonte: O autor.

Figura 8: Proliferação celular avaliada pela contagem de células em proliferação (A) e células em proliferação por μm^2 (B) nas criptas da mucosa do duodeno de leitões lactentes alimentados com dietas contendo óleos funcionais. Barras representam média e desvio padrão (passaram pelo teste de normalidade de Anderson Darling). ^{abc} Letras diferentes no mesmo gráfico diferem pelo Teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: O autor

2.4 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da suplementação de FO sobre o desenvolvimento do duodeno de leitões lactentes, com o objetivo de proporcionar uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento na suinocultura e possibilitar uma melhoria da qualidade intestinal para o melhor enfrentamento dos desafios que os leitões estarão expostos na fase posterior ao desmame.

A morfologia da parede do duodeno manteve-se preservada em todos os tratamentos. No entanto, nos leitões que não receberam óleos funcionais (tratamento NC) foram observados, com frequência, vasos sanguíneos congestionados na lâmina própria das vilosidades. Esse achado sugere a possibilidade do estabelecimento de um estado inflamatório na mucosa, já que foi observada, de forma qualitativa, uma alta densidade de células de defesa, principalmente plasmócitos. A presença desses vasos foi muito menos frequente nos demais tratamentos, principalmente no FOAll e ANTPig. Esse achado sugere um papel protetor do FO, consumido no leite e na ração pelos leitões, sobre a morfologia intestinal.

Mass (2019) mostrou que os mesmos FO desse estudo atuam sobre a microbiota intestinal, aumentando a diversidade de bactérias que colonizam o trato gastrointestinal em leitões lactentes. Entretanto, leitões ANTPig apresentaram menor diversidade com maior população de bactérias do gênero *Lactobacillus* que permitem um ambiente favorável para o trofismo epitelial. Dessa forma, a morfologia semelhante da mucosa intestinal de leitões FOAll e ANTPig indica que tanto óleos funcionais e os antimicrobianos (Sulfametoxazol e Trimetoprim) podem evitar o desenvolvimento de bactérias enteropatogênicas.

O intestino delgado se caracteriza por ser o principal órgão de absorção e transporte de nutrientes para os leitões e uma mucosa intestinal saudável é importante para garantir a função normal de digestão, sendo a absorção de nutrientes dependente das vilosidades do intestino delgado (ZHAXI et al., 2020)

No nosso estudo, leitões que receberam dietas ANTPig, seguidos de leitões FOAll, apresentaram uma maior altura de vilosidades no duodeno, evidenciando que o uso de FO na ração de porcas durante o período que antecede o parto (seis dias nesse experimento) e manutenção da sua administração via ração durante o período de lactação (nesse estudo, os leitões também tiveram acesso à ração com FO a partir de 10 dias de vida), induziu ao melhor desenvolvimento das vilosidades intestinais. Resultados semelhantes foram demonstrados por Hu et al. (2017) que observaram um aumento semelhante no comprimento das vilosidades no duodeno de leitões alimentados com FO e tratados com antibiótico.

Em estudo realizado por Long et al. (2019), a altura das vilosidades intestinais de leitões alimentados com fitoterápicos foi numericamente maior em aproximadamente 11% no duodeno, em relação ao grupo controle, e os resultados foram semelhantes aos alcançados pelo grupo tratado com antibiótico clortetraciclina. O aumento na altura das vilosidades repercute em uma melhora na digestibilidade dos nutrientes (LONG et al., 2019) e colabora para que o intestino tenha uma maior área de absorção, fato que pode auxiliar na redução dos impactos gerados com o desmame.

Corroborando com esses resultados, o duodeno dos leitões dos tratamentos FOAll e ANTPig mostrou maior área absorptiva em relação aos demais grupos. Além disso, essa área absorptiva apresentou forte correlação com a altura das vilosidades. O intestino de leitões neonatais também é considerado anatômica e funcionalmente imaturo e é hipersensível ao desmame (WANG et al., 2016). Essa área de absorção aumenta cerca de 50% no primeiro dia pós-natal e 100% durante os primeiros 10 dias após o nascimento (MARION; DIVIDICH, 2003). Uma grande área de superfície luminal com maturidade funcional de enterócitos ideal é importante para leitões para que eles possam atingir sua capacidade digestiva e de absorção máxima (WANG et al., 2016).

Considerando a largura das vilosidades, os leitões do tratamento FOAll apresentaram maiores valores em comparação com o ANTPig e valores semelhantes em relação aos demais tratamentos. Embora o aumento da largura das vilosidades possa sugerir formação de edema e aumento na quantidade de células de defesa em resposta a diversas infecções (TREVIZAN et al., 2016), o duodeno dos leitões do tratamento FOAll não mostrou alterações histopatológicas. Em estudo recente, Su et al. (2020) observaram que ao utilizar uma mistura de FO de timol e cinamaldeído, as medidas de largura das vilosidades do duodeno não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Adicionalmente, probióticos utilizados na alimentação de leitões mostraram que, nos grupos em que as vilosidades eram mais largas e mais longas, as microvilosidades estavam intactas e com borda estriada bem formada, resultando em uma melhor saúde desses animais (ZHAXI et al., 2020).

O duodeno dos leitões do tratamento ANTPig apresentou maior profundidade das criptas em relação ao do grupo FOAll e ambos foram maiores que os demais tratamentos. Hu et al. (2017) também demonstraram que, nos animais tratados com fitoesteróis e no grupo controle, a profundidade das criptas foi semelhante, enquanto que os animais tratados com o antibiótico colistina apresentaram maiores valores de profundidade das criptas. Resultados semelhantes foram observados por Long et al., (2019) em que o tratamento com FO diminuiu a profundidade de criptas, comparável com os resultados alcançados com o tratamento

antibiótico clortetraciclina. Esses resultados sugerem que a diminuição no número de bactérias patogênicas no intestino, pela utilização de antibióticos, pode melhorar a proliferação das células epiteliais para a produção de vilosidades, com melhora na saúde intestinal (MOURÃO et al., 2005).

Na avaliação da relação entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas, não foi observada diferença entre os tratamentos. Esse parâmetro é um indicativo da integridade do epitélio devido ao equilíbrio entre os processos de divisões mitóticas, migração e extrusão das células, que determinam a capacidade digestiva e absorptiva desse tecido (OLIVEIRA et al., 2017; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Nossos resultados sugerem que o epitélio intestinal do duodeno dos leitões manteve-se íntegro, independentemente do tipo de tratamento, o que condiz com o observado na análise dos cortes histológicos que mostraram vilosidades com morfologia preservada.

Considerando a densidade dos vilos por μm^2 de área do duodeno, o tratamento FOAll mostrou os maiores valores em relação ao tratamento NC, considerando que foram analisadas somente vilosidades inteiras orientadas longitudinalmente. A integridade dos epitélios da mucosa intestinal está intimamente relacionada à função de barreira mecânica que protege contra a invasão e infecção por microrganismos patogênicos (ZHAXI et al., 2020). FOs possuem características miorelaxantes e antiespasmódicos e são capazes de estimular o trânsito intestinal, possivelmente devido à diminuição da resistência luminal à propulsão da digesta intestinal (MAGALHÃES et al., 1998). A espessura e fragilidade da parede intestinal também está relacionada à função de barreira física e peristaltismo, pois quando a parede do intestino se torna fina, os movimentos peristálticos diminuem e o acúmulo de alimento não digerido causa fermentação anormal, retenção de patógenos, aumentando as chances de infecção e podendo resultar em diarreia (BAUER et al., 2006).

O epitélio intestinal é recoberto, principalmente, por uma camada de muco constituído por glicoproteínas mucinas que são sintetizadas e secretadas pelas células caliciformes. Dessa forma, essas células desempenham uma importante função protetora no intestino, pois o muco é considerado a primeira linha de defesa de inata contra lesões epiteliais induzidas por patógenos (DKHIL; DELIC; AL-QURAI SHY, 2013).

Nesse estudo, o duodeno dos leitões dos tratamentos ANTPig e FOAll mostrou um menor número de células caliciformes por μm^2 . Resultados semelhantes foram observados por Zeinali et al. (2017) que demonstraram, no intestino de frangos, um menor número de células caliciformes nos tratamentos com FO, em comparação com o tratamento controle. Muitos estudos têm demonstrado a influência positiva de extratos de plantas medicinais sobre a

morfologia intestinal, inclusive sobre a densidade e tamanho de células caliciformes, afetando a síntese e secreção de mucina. Nesse sentido, os FO da dieta podem ajudar a compensar uma diminuição da secreção de mucina (ZEINALI et al., 2017).

A análise imunohistoquímica dos cortes de duodeno dos leitões lactentes mostrou que os grupos FOSow e FOAll apresentaram as maiores quantidades de células em proliferação por μm^2 . Esses resultados sugerem a influência dos FO de mamona e casca de caju sobre a proliferação celular nas criptas do duodeno quando administrados via ração, a partir dos 10 dias de vida, e pelo leite materno, já que as porcas receberam as dietas 6 dias antes do parto.

Não foram conduzidos estudos sobre o uso de FO e seus efeitos sobre a proliferação celular nas criptas do duodeno de leitões lactentes, isso torna a nossa pesquisa inédita e contribui para que os resultados observados sejam utilizados para embasamento e comparação em estudos posteriores.

A maioria dos estudos sobre a proliferação celular intestinal avaliam o período pós-desmame. O índice de marcação de células PCNA positivas no jejuno aumenta gradualmente em associação com a maturação da mucosa de 1 a 21 dias em leitões lactentes, e apresenta redução acentuada nesse percentual três dias após o desmame (WANG et al., 2016). A renovação das células epiteliais intestinais é um processo altamente coordenado, sendo que a maioria é eliminada no lúmen intestinal a cada 3 a 5 dias por apoptose. A rápida proliferação de células perto da base da cripta tem um papel fundamental em repor essas células perdidas e apoiar o crescimento intestinal, sua manutenção e recuperação de danos gerados nos tecidos do intestino (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2008).

É bem estabelecido que as mudanças no ambiente em que os leitões estão expostos, durante esse período, torna-os mais suscetíveis a doenças que comumente causam diarreia severa. Antibióticos são comumente usados para controlar a diarreia após desmame. No entanto, alternativas naturais a esses medicamentos têm sido utilizados para melhorar a saúde animal e o desempenho produtivo (ZHAXI et al., 2020). O estudo de Long et al. (2019) mostrou que leitões alimentados com dietas contendo FO ou que receberam antibiótico apresentaram uma redução significativa nas taxas de diarreia logo após o desmame, possivelmente devido ao menor conteúdo de *E. coli* nas fezes; sabe-se que a diarreia causada por *E. coli* é um grande desafio para leitões pós-desmame.

Embora o período pós-desmame não tenha sido avaliado nesse estudo, nossos resultados mostraram que a ingestão de FO tanto na ração quanto no leite materno (tratamento FOAll) pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos após o desmame. Esses FO promoveram alterações benéficas semelhantes na mucosa intestinal, conforme observado no

tratamento ANTPig, como aumento na altura das vilosidades, maior profundidade das criptas, maior área absorptiva, maior densidade das vilosidades e menor número de células califormes quando comparados aos leitões NC, FOPig e FOSow. Outros benefícios na utilização de FO nas dietas, considerando o período após o desmame, tem sido descritos na literatura, como melhora no desempenho de crescimento (SU et al., 2020) e ação antioxidante (WU et al., 2019; XIE et al., 2016).

2.5 CONCLUSÃO

Os óleos funcionais de mamona e casca de caju, quando administrados via ração para porcas e leitões demonstraram ser uma alternativa na substituição ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para leitões lactentes, pois apresentaram resultados semelhantes ao grupo tratado com antibiótico sulfametoxazol e trimetoprim em relação a melhoria de altura de vilosidades, profundidade de criptas, área absorptiva e densidade de vilos.

Os grupos que as porcas receberam dietas contendo óleos funcionais apresentaram os maiores índices de células em proliferação nas criptas duodenais dos leitões lactentes, tanto para o grupo que porcas e leitões receberam dietas contendo óleos funcionais quanto para o grupo que somente as porcas receberam óleos funcionais.

REFERÊNCIAS

- BAUER, E. et al. Highly recommended books on Probiotics and Foodborne Pathogens Influence of the Gastrointestinal Microbiota on Development of the Immune System in Young Animals. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 7, n. October, p. 35–52, 2006.
- BROWN, D. C. et al. The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 3–4, p. 187–198, 2006.
- CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, n. 6, p. 503–512, 2012.
- CHENG, C. et al. Supplementing Oregano Essential Oil in a Reduced-Protein Diet Improves Growth Performance and Nutrient Digestibility by Modulating Intestinal Bacteria, Intestinal Morphology, and Antioxidative Capacity of Growing-Finishing Pigs. **Animals**, v. 8, n. 9, p. 159, 2018.
- CHO, J. H. et al. Effects of essential oils supplementation on growth performance, IgG concentration and fecal noxious gas concentration of weaned pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 1, p. 80–85, 2006.
- DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.
- DIAO, W. et al. Chemical composition , antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill .). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109–116, 2014.
- DKHIL, M. A.; DELIC, D.; AL-QURAI SHY, S. Goblet cells and mucin related gene expression in mice infected with *Eimeria papillata*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–6, 2013.
- FOUHSE, J. M.; ZIJLSTRA, R. T.; WILLING, B. P. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 30–36, 2016.
- GIANNENAS, I. et al. Dietary Supplementation of Benzoic Acid and Essential Oil Compounds Affects Buffering Capacity of the Feeds, Performance of Turkey Poults and Their Antioxidant Status, pH in the Digestive Tract, Intestinal Microbiota and Morphology. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 225–236, 1 Feb. 2014.
- GOUVEA, S.; ROSENTHAL, A.; HELENA, E. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses : a review. **Ciência Rural**, v. 47, 2017.
- HU, Q. et al. Phytosterols on growth performance, antioxidant enzymes and intestinal morphology in weaned piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 4629–4634, 2017.
- KNEZEVIC, P. et al. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 125–136, 2016.

- KROISMAYR, A. et al. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, p. 377–387, 2008.
- LÁZÁR, V. et al. Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 700, 2013.
- LI, P. et al. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 11, p. 1617–1626, 2012.
- LI, Y. et al. Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–13, 2018.
- LONG, S. et al. Effects of Forsythia Suspense Extract as an Antibiotics Substitute on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Serum Antioxidant Capacity, Fecal Escherichia coli Concentration and Intestinal Morphology of Weaned Piglets. **Animals**, v. 9, p. 729, 2019.
- MAGALHÃES, P. J. C. et al. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 172–177, 1998.
- MANZANILLA, E. G. et al. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of animal science**, v. 82, n. 11, p. 3210–8, 2004.
- MARION, J.; DIVIDICH, J. LE. Nutrient – Gene Interactions Weaning and Feed Intake Alter Pancreatic Enzyme Activities and Corresponding mRNA Levels in 7-d-Old Piglets. **American Society for Nutritional Sciences**, n. August, p. 362–368, 2003.
- MASS, A. P. R.. **Uso de óleos funcionais da alimentação de porcas lactantes e leitegadas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.
- MOURÃO, J. L. et al. Effect of mannan oligosaccharides on the performance , intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 107–120, 2005.
- MENCARELLI, A. et al. Calcineurin-mediated IL-2 production by CD11c^{high}MHCII⁺ myeloid cells is crucial for intestinal immune homeostasis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. DE. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, p. 1451–1474, 2013.
- OLIVEIRA, E. R. et al. Chitoooligosaccharide for piglets: Effects on performance, viscera and intestinal morphometry. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 38, n. 4, p. 2727–2742, 2017.
- OMONJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 126–136, 2018.
- PATHAK, M. et al. Effects of dietary supplementation of cinnamaldehyde and formic acid on growth performance, intestinal microbiota and immune response in broiler chickens. **Animal Production Science**, v. 57, n. 5, p. 821–827, 2017.

- PEACE, R. M. et al. Spray-dried porcine plasma influences intestinal barrier function, inflammation, and diarrhea in weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 7, p. 1312–1317, 2011.
- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: A review. **Livestock Production Science**, v. 51, n. 1–3, p. 215–236, 1997.
- SEAL, B. S. et al. Microbial-derived products as potential new antimicrobials. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 1–12, 2018.
- SILVA, D. R. P. da. **Adição de L- glutamina + ácido glutâmico e L-arginina na dieta de leitões recém-desmamados**. 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.
- SU, G. et al. Dietary supplementation of plant essential oil improves growth performance, intestinal morphology and health in weaned pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 2, p. 579–589, 2020.
- TREVIZAN, A. R. et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 22–29, 2016.
- VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. **Annual Review of Physiology**, v. 71, n. 1, p. 241–260, 2008.
- WANG, J. et al. Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning periods. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2016.
- WINDISCH, W. et al. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. E140–E148, 2008.
- WU, Z. et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 15, 2019.
- XIE, C. et al. Effect of maternal supplementation with chitosan oligosaccharide on the antioxidant capacity of suckling piglets. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 7, p. 453–456, 2016.
- XIONG, X. et al. Nutritional Intervention for the Intestinal Development and Health of Weaned Pigs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. February, p. 1–14, 2019.
- XU, Y. T. et al. Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, 2017.
- YAN, L. et al. Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower-finisher pigs. **Livestock Science**, v. 128, n. 1–3, p. 115–122, 2010.
- ZEINALI, S. et al. Mucin2 gene expression in the chicken intestinal goblet cells are affected

by dietary essential oils. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 23, n. 1, p. 134–141, 2017.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017.

ZENG, Z. et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 279–285, 2015a.

ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, 2015b.

ZHANG, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, 2016.

ZHAXI, Y. et al. Duan-Nai-An, A Yeast Probiotic, Improves Intestinal Mucosa Integrity and Immune Function in Weaned Piglets. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.