

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Daniela Regina Klein

**SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA LEITÕES NO PERÍODO
DE TRANSIÇÃO PÓS-DESMAMA: DESEMPENHO,
COMPORTAMENTO, MORFOMETRIA E MICROBIOTA
INTESTINAL**

**Santa Maria, RS
2023**

Daniela Regina Klein

**SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA LEITÕES NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO
PÓS-DESMAMA: DESEMPENHO, COMPORTAMENTO, MORFOMETRIA E
MICROBIOTA INTESTINAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal – Nutrição de Não-Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir de Oliveira

**Santa Maria, RS
2023**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Klein, Daniela Regina
SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA LEITÕES NO PERÍODO DE
TRANSIÇÃO PÓS-DESMAMA: DESEMPENHO, COMPORTAMENTO,
MORFOMETRIA E MICROBIOTA INTESTINAL / Daniela Regina
Klein.- 2023.
96 p.; 30 cm

Orientador: Vladimir de Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2023

1. Desmame de leitões 2. Desempenho de leitões 3.
Morfometria intestinal 4. Microbiota intestinal I.
Oliveira, Vladimir de II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DANIELA REGINA KLEIN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Daniela Regina Klein

**SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA LEITÕES NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO
PÓS-DESMAMA: DESEMPENHO, COMPORTAMENTO, MORFOMETRIA E
MICROBIOTA INTESTINAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal – Nutrição de Não-Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Zootecnia**.

Aprovada em 10 de março de 2023:

Prof. Dr. Vladimir de Oliveira (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Professor, Dr. Arlei Rodrigues Bonet de Quadros (UFSM)

Professora, Dra. Fabiana Quoos Mayer (UFRGS)

Professor, Dr. Marcos Martinez do Vale (UFPR)

Professor, Dr. Silvio Teixeira da Costa (UFSM)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

À minha família e namorado Victor pelo apoio, amor, e por sempre estarem ao meu lado nos momentos que precisei.

Ao orientador Prof^o. Vladimir pela oportunidade, paciência e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório e de pós-graduação por toda ajuda e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

A Capes pela a bolsa de estudos.

Enfim, agradeço de coração a todos que, de alguma forma contribuíram na caminhada para que eu chegasse até aqui.

EPÍGRAFE

*“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo. Todos
nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos
alguma coisa. Por isso
aprendemos sempre.”*

Paulo Freire

RESUMO

SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA LEITÕES NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO PÓS-DESMAMA: DESEMPENHO, COMPORTAMENTO, MORFOMETRIA E MICROBIOTA INTESTINAL

AUTORA: Daniela Regina Klein
ORIENTADOR: Prof^o. Dr. Vladimir de Oliveira

O pós-desmame é um dos períodos de maior estresse na vida dos suínos, seja em função do afastamento da mãe, da adaptação a um novo ambiente ou com leitões de diferentes leitegadas, e o desafio de adaptação a uma alimentação sólida e ingredientes vegetais. Os objetivos da presente tese foram comparar o desempenho, histologia intestinal e comportamento alimentar em leitões recebendo suplemento lácteo, e por meio de uma metanálise avaliar os efeitos de características das dietas na composição da microbiota intestinal em leitões no período pós-desmame. Foi realizada uma revisão de literatura resumindo a composição do microbioma, a importância para manutenção da saúde, influência da alimentação e nutrientes, de situações de estresse, e de promotores de crescimento e antimicrobianos na microbiota intestinal de leitões desmamados. Para o segundo artigo foram realizados dois experimentos avaliando o efeito da oferta de um sucedâneo lácteo a leitões recém-desmamados durante três e quatro dias, sobre o desempenho, morfologia e saúde intestinal e comportamento. No terceiro artigo foi realizada uma metanálise analisando o efeito de características e composição da dieta na composição da microbiota intestinal. A composição microbiota intestinal dos leitões possui influência na saúde, nutrição e desempenho dos animais, e a sua modulação por meio da alimentação ou aditivos mostra resultados promissores, contribuindo para a saúde e desempenho e também para a redução no uso de antimicrobianos na produção animal. Os experimentos do segundo artigo, utilizando leitões desmamados aos 21 e 30 dias de idade, recebendo duas dietas: ração sólida; e ração sólida + suplemento lácteo durante quatro e três dias após o desmame. O fornecimento de suplemento lácteo para leitões no período pós-desmame não afetou o desempenho, o índice de diarreia ou o comportamento. Leitões que receberam o suplemento lácteo tiveram maior consumo de ração no segundo e terceiro dias após o desmame, e também apresentaram maior comprimento das vilosidades do duodeno e placas de Peyer maiores. No estudo de metanálise foram avaliados o efeito da adição de substâncias moduladoras da microbiota intestinal na dieta e o efeito de subgrupos das características e composição da dieta sobre os principais filos da microbiota intestinal de leitões desmamados. Os filos mais abundantes na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados foram Firmicutes e Bacteroidetes, que não foi influenciada pela adição de substâncias moduladoras nas dietas. Dietas com aveia, cevada, trigo e arroz mostraram efeito na abundância dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria. Leitões que ingeriram uma maior quantidade de proteína apresentaram uma abundância maior do filo Firmicutes, enquanto nos com menor consumo de proteína o filo Bacteroidetes foi mais abundante. Animais com consumo de energia metabolizável menor apresentaram maior abundância do filo Firmicutes em sua microbiota intestinal.

Palavras-chave: Bem-estar. Metanálise. Microbiota intestinal. Saúde intestinal.

ABSTRACT

PIGLETS FEED SUPPLEMENTATION IN THE POST-WEANING PERIOD: PERFORMANCE, BEHAVIOUR, MORPHOMETRY AND GUT MICROBIOTA

AUTHOR: Daniela Regina Klein
ADVISOR: Prof^o. Dr. Vladimir de Oliveira

Post-weaning is one of the most stressful periods in pigs' lives, either due to the removal from the mother, adaptation to a new environment or different litters piglets, and the challenge to adapt to a solid diet and vegetable ingredients. The aims of the present thesis were to compare the performance, intestinal histology and feeding behaviour in piglets supplemented with milk replacer, and with a meta-analysis evaluate the effects of diet characteristics and composition on post-weaning piglets gut microbiota. A literature review summarised the composition of the microbiome, the importance for health, and the influence of feed, stress situations, and growth promoters and antimicrobials on weaned piglets gut microbiota. For the second article, two experiments evaluated the effect of a milk replacer supplementation for newly weaned piglets, for three and four days, on performance, intestinal morphology and health, and behaviour. In the third article a meta-analysis analysed the effect of diet characteristics and composition on gut microbiota composition. The composition of piglets gut microbiota influenced the health, nutrition and performance and, its modulation by feeding or feed additives showed promising results, which contributed to the health, performance and also reduce antimicrobials use in animal production. The experiments of the second article, using piglets weaned at 21 and 30 days of age, feeding two diets: solid feed; and solid feed + milk replacer for four and three days after weaning. The milk replacer supplementation to post-weaning piglets did not affect performance, diarrhoea index or behaviour. Piglets supplemented with milk replacer intake more feed on the second and third days after weaning, and had longer duodenal villus and larger Peyer's patches. In the meta-analysis study were evaluated the gut microbiota modulating feed additives, diet characteristics and composition effects on the main phylum of weaned piglets gut microbiota. The most abundant phylum in weaned piglets gut microbiota composition were Firmicutes and Bacteroidetes, which was not influenced by modulating feed additives. Diets with barley, wheat and rice showed an effect on the abundance of the phylum Bacteroidetes and Actinobacteria. Piglets which had intake a higher amount of protein showed a higher abundance of the phylum Firmicutes, and in those intakes lower protein the phylum Bacteroidetes was more abundant. Animals that intake less metabolizable energy had higher abundance of Firmicutes in gut microbiota.

Keywords: Gut health. Gut microbiota. Meta-analysis. Welfare.

SUMÁRIO

1 - APRESENTAÇÃO	10
2 - REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 O DESENVOLVIMENTO GASTROINTESTINAL DE LEITÕES.....	12
2.2 O EPITÉLIO INTESTINAL E A MANUTENÇÃO DA SAÚDE	14
2.3 A MICROBIOTA INTESTINAL EM LEITÕES	17
2.4 O PAPEL DA NUTRIÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO TRATO GASTROINTESTINAL	19
3- ARTIGO I - PIGLETS' GUT MICROBIOTA DYNAMICS	22
4- ARTIGO II - PERFORMANCE, INTESTINAL MORPHOLOGY AND BEHAVIOR OF WEANED PIGLETS SUPPLEMENTED WITH MILK REPLACER	31
5- ARTIGO III - EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DA DIETA SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE LEITÕES DESMAMADOS: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE	60
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	96

1 - APRESENTAÇÃO

O desmame dos leitões geralmente ocorre entre 3 e 4 semanas de vida, quando a maioria dos nutrientes é ingerida através do leite. O desmame está associado à mistura de leitegadas e, também, causando estresse social e ambiental. Além disso, ocorre a troca de dieta líquida para dieta sólida, com ingredientes vegetais, necessitando se adaptar rapidamente a essas novas condições, o que resulta em uma redução significativa da digestibilidade dos nutrientes na primeira semana após o desmame (LE DIVIDICH e SEVE, 2000).

O desmame precoce na suinocultura contribui para o aparecimento de distúrbios intestinais em leitões, que são a principal causa da diminuição no desempenho e do crescimento, da incidência de diarreias, e uso profilático de antibióticos (FURBEYRE, et al., 2017). Ele é realizado numa idade em que a capacidade de resposta imune dos animais não está totalmente desenvolvida. Além de alterações anatômicas e fisiológicas, é comum verificar falta de apetite, perda de peso, diarreias, morbidade e mortalidade, principalmente na primeira semana pós-desmame dos leitões (BARSZCA et al, 2011; MOESER et al., 2017; GUEVARRA et al., 2018).

O estresse típico do desmame leva a uma diminuição da altura das vilosidades e um processo inflamatório persistente, possivelmente decorrente de alterações na estrutura das células epiteliais, facilitando a infecção por patógenos (BURKHOLDER et al., 2008). O desmame causa deterioração da barreira intestinal devido a hormônios do estresse cronicamente elevados e redução do consumo de ração (SMITH et al., 2010; CAMPBELL et al., 2013). A produção de muco lubrifica o intestino e protege o sistema imunológico, porém agentes estressores podem reduzir as contagens de células caliciformes nas vilosidades levando a uma redução na camada de muco e aumento suscetibilidade à infecção (JOHANSSON et al., 2013).

De um modo geral, os cuidados sugeridos para a redução das consequências do desmame precoce priorizam os seguintes elementos: leitão, ambiente, manejo e nutrição. A nutrição ocupa papel relevante e uma rápida iniciação a alimentação é essencial para manter a estrutura intestinal e desempenho de leitões desmamados. Muitos dos problemas observados nos leitões recém desmamados são amenizados pelo fornecimento de dietas com adição de antibióticos e/ou promotores de crescimento. Nos últimos anos, diversos países estão proibindo o uso de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal, seguindo as recomendações de órgãos internacionais, como a Organização Mundial da Saúde

(OMS), devido ao risco de resistência bacteriana que afeta diretamente a saúde da população. Assim, com a crescente e irreversível proibição desses produtos na dieta de suínos, tem aumentado consideravelmente o interesse na busca por alternativas que possam amenizar ou, até mesmo, suprimir os impactos negativos que o desmame precoce tem sobre grande parte dos leitões (HEO et al., 2012).

Os objetivos deste estudo foram comparar o desempenho, incidência de diarreias, histologia intestinal e comportamento alimentar em leitões recebendo suplemento lácteo nos primeiros dias pós desmame. E também por meio de uma metanálise avaliar os efeitos da adição de moduladores da microbiota intestinal, do tipo de dieta, e a relação do consumo de proteína bruta, energia metabolizável e lisina na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma artigos científicos. O primeiro artigo é composto por uma revisão de literatura que visou sumarizar a composição e diversidade do microbioma de leitões, a importância para manutenção da saúde, influência da alimentação e nutrientes, de situações de estresse, e de promotores de crescimento e antimicrobianos na microbiota intestinal. O segundo artigo, baseado em um experimento, buscou avaliar o efeito da oferta de um sucedâneo lácteo sobre o desempenho, incidência de diarreia, morfologia do trato gastrointestinal e comportamento de leitões recém-desmamados. O terceiro artigo, uma metanálise que visou analisar a composição da microbiota intestinal de leitões no pós-desmame em função das características nutricionais das dietas.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O DESENVOLVIMENTO GASTROINTESTINAL DE LEITÕES

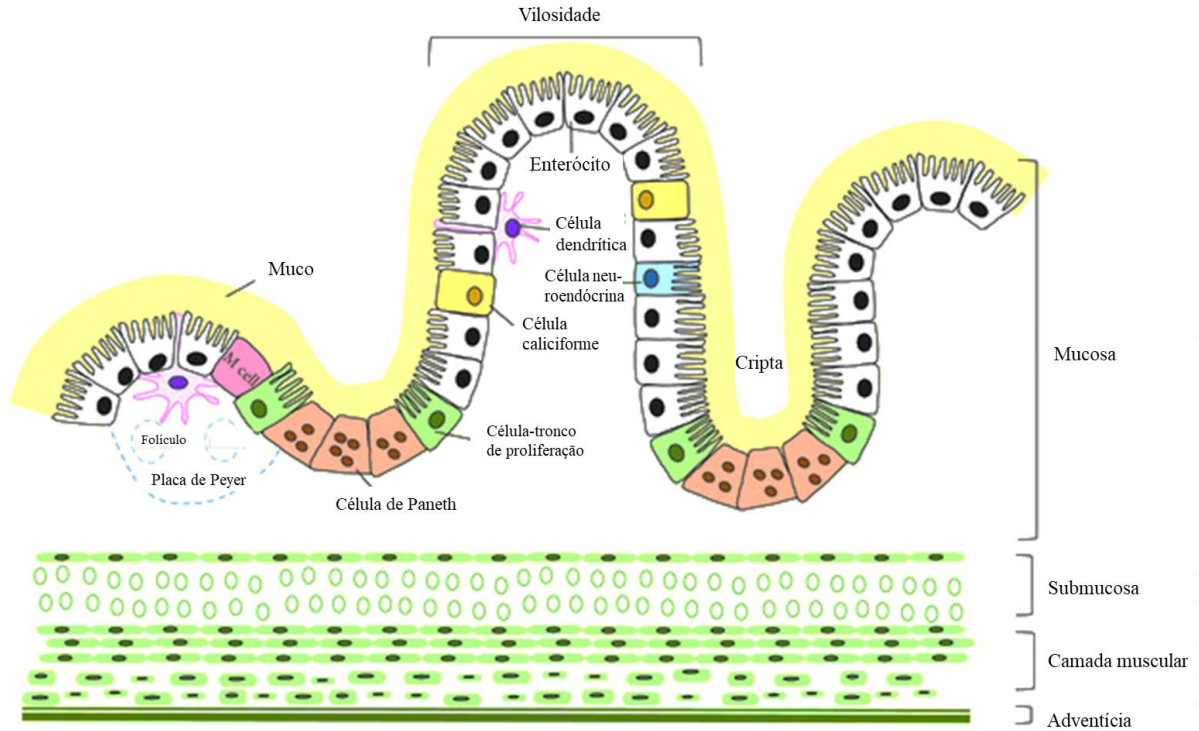
O trato gastrintestinal dos suínos é um sistema complexo e de alta especialidade, cujas principais funções, mas não as únicas são: digestão de alimentos e absorção de nutrientes, e seu desenvolvimento inicia entre 28 e 36 dias de gestação. Após o nascimento, o intestino de mamíferos passa por duas fases principais de desenvolvimento (KELLY e COUTTS, 2000): uma envolve a preparação para a vida extrauterina, quando o colostro e o leite materno são a única fonte de nutrientes. A segunda fase do desenvolvimento intestinal está associada a uma mudança na capacidade digestiva do epitélio para utilizar eficientemente alimentos sólidos e quimicamente complexos. O intestino delgado pode ser comparado a um tubo, atingindo, em média três e cinco metros de comprimento, ao nascimento e ao desmame, respectivamente. Também é o principal sítio de absorção de nutrientes, e uma importante zona de colonização por parte de agentes microbianos.

As características estruturais dos tecidos que formam o intestino são semelhantes desde o duodeno até o íleo. O intestino delgado possui uma camada serosa externa, três musculares, uma submucosa e uma camada mucosa. A submucosa é constituída basicamente por tecido conjuntivo, possui células glandulares secretoras, vasos sanguíneos e tecido linfático do intestino (conhecido como sistema G.A.L.T (*gut-associated lymphoid tissue*)).

O G.A.L.T é basicamente formado por folículos linfoides agregados como as placas de Peyer do íleo, onde ocorre a indução das respostas imunes adaptativas (reconhecimento de antígenos, ativação e diferenciação dos linfócitos T e B) contra antígenos imunogênicos no intestino delgado. Os antígenos do lúmen intestinal são transportados para as placas de Peyer por meio das células M (*microfold cells*), permitindo que células dendríticas e macrófagos teciduais capturem esses antígenos para serem transportados até os folículos linfoides (OHNO, 2016).

A mucosa, por sua vez, forma o revestimento interno intestinal e possui funções de digestão, absorção, secreção e também de proteção intestinal (Figura 1). A mucosa do intestino delgado é formada por três camadas, sendo que uma delas, constituída de tecido conjuntivo (lâmina própria), que divide a camada de tecido muscular de outra, mais interna, formada por apenas uma camada de tecido epitelial. A mucosa apresenta dobras que expandem substancialmente a área de absorção intestinal. Esse formato resulta em duas regiões distintas denominadas criptas e vilosidades.

Figura 1: Estrutura do epitélio intestinal (intestino delgado) de um suíno.



Fonte: Adaptado de Kong; Zhang e Zhang (2013).

As criptas, são invaginações do epitélio que abrigam células responsáveis por dar origem as demais células que recobrem as vilosidades. As vilosidades, por sua vez, são projeções formadas por células absorptivas e células secretoras. O epitélio intestinal nessa área é caracterizado pela rápida proliferação de células nas criptas, seu *turnover* é rápido e contínuo e dura de quatro a cinco dias (QI e CHEN, 2015). As criptas são formadas por células que sofrem uma série de transições e que, em última análise, diferenciam-se em quatro tipos de células, podendo ser absorventes (enterócitos) e/ou secretoras (células enteroendócrinas, células caliciformes e células de paneth; ZHOU et al, 2017). Os enterócitos constituem até 90% das células epiteliais. As células de paneth migram para a base de criptas, enquanto que as células enteroendoendócrinas e as células caliciformes migram às vilosidades (BARKER, 2014). A proliferação, a diferenciação e a apoptose de células epiteliais intestinais desempenham papéis importantes no intestino como desenvolvimento, manutenção e recuperação de danos ao epitélio intestinal (BARSZCA e SKOMIAŁ, 2011).

A camada de tecido epitelial da mucosa intestinal é fundamental para processos de digestão e absorção de nutrientes, controle do fluxo bidirecional de água e eletrólitos e também atua como uma barreira física de proteção do intestino (WIJTTTEN et al., 2011). Enzimas localizadas na borda em escova dos enterócitos atuam na digestão final de alimentos, enquanto transportadores localizados nas porções apical e basolateral da célula absorptiva facilitam a absorção e o fluxo bidirecional de água e eletrólitos (MOESER et al., 2017). As células epiteliais são protegidas por uma camada mucina, células glicoproteicas, que também atuam como primeira linha de defesa e protegem os animais de microrganismos patogênicos, toxinas e antígenos que atingem o lúmen intestinal (XIONG et al., 2019a).

O sistema epitelial também abriga células imunes, incluindo células dendríticas, células T, células B e macrófagos, as quais funcionam em associação estreita com as células epiteliais para manter a homeostase intestinal (CHELAKKOT et al., 2018). O impacto do estresse do desmame nos enterócitos de leitões desregula a expressão das proteínas envolvidas no ciclo do ácido tri carboxílico, na β -oxidação e na glicólise (XIONG et al, 2015). Também afeta a expressão de proteínas relacionadas com vários metabolismos celulares ou processos biológicos, como o metabolismo energético, lipídico e proteico, o transporte de íons, e diferenciação e apoptose de células, afetando a proliferação de células epiteliais intestinais em leitões desmamados (YANG et al, 2016; WU et al, 2017).

2.2 O EPITÉLIO INTESTINAL E A MANUTENÇÃO DA SAÚDE

O epitélio gastrointestinal forma a maior interface com o ambiente externo. Proporciona efetivamente uma barreira que limita seletivamente a permeabilidade das toxinas e antígenos através da mucosa, mas permite a absorção de nutrientes e água (POWELL, 1981). As células epiteliais e a camada mucosa do intestino delgado fornecem a primeira linha de defesa para proteger os leitões desmamados de vários microrganismos nocivos, toxinas ou antígenos do trato intestinal (CAMPBELL et al, 2013). As células epiteliais são as principais responsáveis pela secreção de fluidos e absorção de nutrientes, além de fornecer uma barreira seletiva contra antígenos nocivos do lúmen. A homeostase entre células epiteliais intestinais e células da lâmina própria subjacente transfere sinais relacionados à imunidade para a imunidade adaptativa local, que posteriormente ajuda a manter a imunidade do intestino (RIMOLDI, et al., 2005).

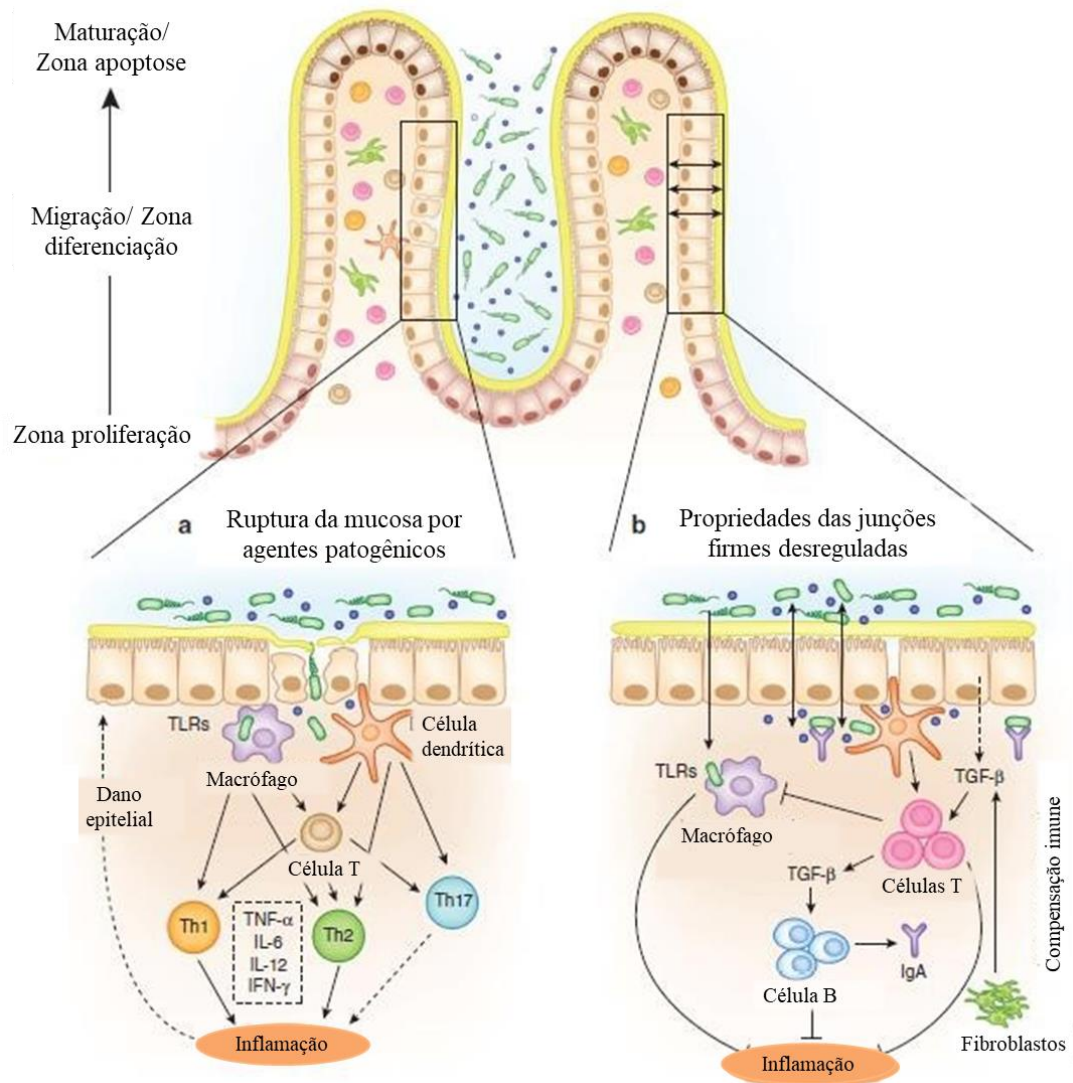
A permeabilidade intestinal é regulada diretamente por proteínas de junção firme (ou *tight junctions*; XIONG et al, 2019b). Essas junções (também conhecidas como *zonula*

occludens) fazem a adesão mais apical de célula a célula entre células epiteliais e endoteliais vizinhas (FARQUHAR e PALADE, 1963). Como o nome indica, atua como uma barreira física cuja função é impedir a passagem livre de íons e pequenos solutos através do espaço entre duas células que interagem entre si.

Para criar esta barreira seletiva, as células utilizam tanto o mecanismo de transporte transcelular como o paracelular. A via paracelular, regulada pelas junções firmes, é responsável pelo maior grau de aderência apical das células (GUMBINER, 1987). No entanto, não é uma barreira impermeável, mas sim que regula seletivamente o que atravessa o espaço paracelular, ou seja, possuem um papel central na regulação da permeabilidade intestinal e da difusão de íons e moléculas através da superfície epitelial (MITIC et al, 2000). Essas junções tem recebido a maior atenção pelo seu papel na regulação da permeabilidade das mucosas em condições normais e patológicas (SU et al, 2009).

Uma ruptura na barreira da mucosa ou uma abertura das junções firmes inicia um processo inflamatório entre o lúmen e a superfície da mucosa (Figura 2). A parte a, em destaque na figura, mostra a ruptura da barreira mucosa, que induz a hiperativação do sistema imunológico da mucosa e provoca uma inflamação crónica (AHMAD et al, 2017). Na parte b, ocorre um vazamento do intestino em direção a lâmina própria devido à abertura das junções firmes. Esse vazamento pode não ser suficiente para induzir a inflamação da mucosa, podendo antes induzir uma resposta imunitária adaptativa devido a uma resposta do sistema imune. O resultado final pode depender dos potenciais efeitos não funcionais das proteínas associadas à barreira, modificadas em condições inflamatórias.

Figura 2: Barreira física e bioquímica do epitélio intestinal para separar eficazmente os antígenos luminais e o sistema imunitário das mucosas.



Fonte: Adaptado de Ahmad et al. (2017).

O estresse do desmame reduz o número de células caliciformes e a produção de mucina, interrompendo a função da barreira epitelial, aumentando a permeabilidade intestinal, e prejudicando as junções firmes, resultando em suscetibilidade a doenças (HU et al, 2013). O dano causado na barreira intestinal em função do desmame não consegue ser restaurado e retornar aos níveis pré-desmame até sete dias após o desmame (WANG et al., 2016).

O estresse do desmame pode induzir alterações morfológicas e fisiológicas, como a atrofia dos vilos e a hiperplasia das criptas (PLUSKE et al, 1997; BROWN et al, 2006), que diminuem a capacidade de absorção e desempenho dos leitões desmamados (LALLÈS et al, 2004). Atividades enzimáticas da borda em escova e a secreção de eletrólitos no intestino

delgado são utilizados como indicadores importantes de maturação e capacidade digestiva em leitões desmamados (PACHA, 2000). Com a mudança de dieta, as atividades das enzimas da borda em escova, tais como lactase e maltase, são drasticamente reduzidas entre três e cinco dias após o desmame (HEDEMANN e JENSEN, 2004). A má absorção de nutrientes no intestino delgado é exacerbada pela redução da absorção e secreção de eletrólitos em suínos recém-desmamados, levando ao aparecimento de diarreias.

2.3 A MICROBIOTA INTESTINAL EM LEITÕES

A microbiota intestinal desempenha papel importante na digestão, as bactérias colonizam os epitélios da mucosa ligando-se com as células epiteliais ou presentes nas camadas de muco na base das vilosidades (EWING, 2009). A composição da microbiota varia de acordo com a área de localização no trato gastrointestinal do animal (KIM e ISAACSON, 2015). Nos suínos são mais numerosas no ceco e no intestino grosso, onde participam nos processos de fermentação, mas algumas espécies também estão presentes no estômago e intestino delgado.

O microbioma é definido como uma comunidade microbiana característica que ocupa um habitat com propriedades físico-químicas distintas, não se referindo apenas aos microrganismos envolvidos, mas também sua atividade e interação com o hospedeiro, resultando na formação de nichos específicos (BERG et al., 2020). A riqueza de espécies da microbiota caracteriza o microbioma gastrointestinal de indivíduos saudáveis (CHATELIER, et al., 2013). O microbioma é importante na nutrição, pois a maioria das bactérias vivem no intestino, principalmente no cólon (SENDER et al., 2016). Os nutrientes para manter o conjunto de bactérias vem de alimentos não digeridos e parcialmente digeridos, que a microbiota transforma em novas moléculas. Em humanos, por exemplo, quanto mais diversificada a dieta, mais diversificado e saudável é o microbioma (HEIMAN e GREENWAY, 2016).

O desenvolvimento e a diversidade precoce da microbiota auxiliam no desenvolvimento do sistema imunológico e na saúde dos leitões, mas ainda há pouca informação disponível a respeito da estrutura e função do microbioma intestinal de leitões no início da vida. Estudos relacionando o peso corporal e a microbiota de leitões desmamados, demonstraram que os animais mais pesados tinham maior diversidade de filos presentes na microbiota, comparados aos animais mais leves (HAN et al., 2017).

Os filos mais abundantes são Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (GUEVARRA et al., 2018). Os Bacteroidetes consistem principalmente de bactérias gram negativas, com características fermentativas e com capacidade de modular o sistema imune de

forma benéfica (COSTELLO et al., 2009), sendo os gêneros bacterianos prevalentes são *Bacteroides* e *Prevotella*. O filo Firmicutes contém os gêneros *Lactobacillus* e *Clostridium* que são imunomoduladores e também abrigam espécies relacionadas à indução de inflamação. O filo Proteobacteria pode ser um indicativo de uma comunidade microbiana instável, sendo parte a espécie *Escherichia coli*, considerada uma bactéria comensal e a sua presença em indivíduos assintomáticos pode ser habitual, entretanto em altas proporções podem estar associada a alterações funcionais do trato gastrointestinal e diarreias (SHIN et al., 2015). E o filo Actinobacteria engloba bactérias do gênero *Bifidobacterium* que possuem funções como a produção de vitaminas, a estimulação do sistema imunológico, a inibição de bactérias potencialmente patogênicas (COSTELLO et al., 2009).

A composição de carboidratos da dieta suína muda abruptamente quando ocorre o desmame e são introduzidos alimentos complexos à base de vegetais. O colostro e o leite suíno contêm nutrientes e componentes imunológicos, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas (imunoglobulinas), bem como, oligossacarídeos e bactérias, que possivelmente atuam como sinais biológicos e modulam o ambiente intestinal e o status imunológico ao longo da vida (TAO et al. 2010). O microbioma do leitão lactante possui maior abundância da família *Bacteroides*, associada à absorção e utilização de lactose e galactose, monossacarídeos e oligossacarídeos presentes no leite suíno (FRESE et al., 2015).

Com o desmame e a necessidade de consumir uma dieta a base de principalmente componentes vegetais, a composição e a capacidade funcional da microbiota passam a hidrolisar polissacarídeos não amiláceos (TAN et al., 2017). O microbioma do leitão após o desmame possui maior abundância da família *Prevotella*, que aumenta a capacidade de degradar a hemicelulose e fermentação de polissacarídeos não amiláceos derivados de plantas (LAMENDELLA et al., 2011; IVARSSON et al., 2014). A abundância relativa de *Lactobacillus* também aumenta em animais desmamados. Os lactobacilos foram recentemente identificados como bactérias com a capacidade de utilizar monossacarídeos e dissacarídeos derivados de plantas, e açúcares simples do leite como lactose, porém não utiliza os açúcares complexos do leite (SCHWAB et al., 2011). Este gênero é reconhecido como uma bactéria que utiliza carboidratos com numerosos genes que codificam uma ampla gama de capacidades funcionais associadas ao transporte e utilização de carboidratos (CAI et al., 2009).

Estudos sugerem que a microbiota intestinal pode ser modulada através dos nutrientes da dieta, como a fibra, proteína e minerais. Um aumento moderado de fibra na dieta de leitões influencia a composição da microbiota (ZHANG et al., 2016). No estudo leitões lactantes foram

submetidos a dietas com alfafa, que é rica em fibras insolúveis (celulose) e em fibras solúveis (pectinas), beneficiando a população microbiana intestinal.

A variação na fonte ou quantidade de proteína da dieta também pode beneficiar a microbiota intestinal de leitões. As fontes de proteína de origem vegetal (farelo de soja e farelo de semente de algodão) mostraram efeitos significativos no microbioma de leitões desmamados, regulando a microbiota e aumentando a proporção de bactérias benéficas (CAO et al., 2016).

Entre as substâncias que podem ser usadas na modulação da microbiota, está o óxido de zinco, que possui propriedades antibacterianas conhecidas, e sua aplicação em altas concentrações em dietas de leitões desmamados, mostrou efeitos transitórios e duradouros sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal, afetando a composição e a atividade metabólica, prevenindo a diarreia pós-desmame (STARKE et al., 2014). Porém a utilização do óxido de zinco está sendo limitada, em função da pouca absorção pelo animal e sua excreção em altas concentrações nos dejetos, resultando em problemas ambientais. Com a utilização dos dejetos como fertilizante, a concentração de zinco na camada superficial do solo aumenta, e o escoamento e a lixiviação levam a contaminação de águas subterrâneas e superficiais (BONETTI, et al., 2021).

Apesar dos resultados promissores, mais estudos são necessários para entender as interações e os mecanismos envolvidos entre a composição da dieta e a composição da microbiota intestinal de leitões (GUEVARRA et al., 2019). O conhecimento da dinâmica do microbioma pode ajudar a manter a imunidade, melhorar o desempenho produtivo e o bem-estar, além de possivelmente reduzir o uso de antimicrobianos no pós-desmame de leitões.

2.4 O PAPEL DA NUTRIÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO TRATO GASTROINTESTINAL

Muitos dos problemas observados nos leitões recém desmamados são amenizados pelo fornecimento de dietas com adição de antibióticos promotores de crescimento. Contudo, com a crescente e irreversível proibição desses produtos na dieta de suínos em diversos países, principalmente na União Europeia, em função dos riscos à saúde humana em decorrência do surgimento de superbactérias com resistência à antimicrobianos. Com isso, tem-se aumentado consideravelmente o interesse na busca por alternativas que possam amenizar ou, até mesmo, suprimir os impactos negativos que o desmame precoce tem sobre grande parte dos leitões (HEO et al., 2012).

Evidentemente a modulação da saúde intestinal, via nutrição, tem recebido grande destaque. Assim, muitos estudos têm sido conduzidos com ingredientes funcionais, fitogênicos, prebióticos e probióticos, ácidos graxos e outros produtos, visando avaliar as possibilidades dessas substâncias contribuírem para reduzir os impactos negativos provocados pelo desmame precoce. Além disso, em muitos casos, a ideia é utilizar aditivos como substitutos dos antibióticos promotores de crescimento.

A literatura apresenta inúmeros resultados demonstrando a importância da ingestão de alimento como um estímulo da homeostase da mucosa intestinal (PLUSKE et al., 1996; PLUSKE et al., 2018). Animais ingerindo ração apresentam redução do número de células intestinais de defesa e menor comprometimento da arquitetura intestinal. A permeabilidade do intestino é comprometida quando não há ingestão de alimentos (SPITZ et al., 1996; MOSER et al., 2017).

O baixo consumo de ração sólida verificado no imediato período pós desmame é apontado como um dos principais moduladores de alterações morfofisiológicas do intestino (PLUSKE et al., 2018; MIDDELKOOP et al., 2018). Leitões desmamados entre 3 e 4 semanas de idade parecem sentir demasiadamente o impacto da retirada do leite materno, independente de terem ou não acesso a ração sólida na maternidade (LE DIVIDICH e SÈVE, 2000; VAN DER MEULEN et al., 2010). Por essa razão, toda a estratégia que venha estimular o consumo dos leitões recém-desmamadas é bem-vinda.

Estima-se que leitões desmamados aos 21 dias de idade, nos quais o leite materno representa 90% da ingestão, precisariam ingerir 1100 gramas de leite *in natura* ou 210 gramas de matéria seca láctea para atingir ganho de peso diário médio de 300 gramas, esperado na última semana de lactação (LE DIVIDICH e SÈVE, 2000). Em termos nutricionais, essa quantia de leite equivale a 60, 62 e 85 g de lactose, proteína e gordura, respectivamente. Além disso, o leite é fonte de inúmeras substâncias que exercem efeito na homeostase do intestino delgado.

A ingestão de matéria seca na primeira semana pós desmama representa em torno de 60 a 65% daquela verificada na última semana pré-desmama (LE DIVIDICH e SÈVE, 2000). Isso ocorre mesmo em situações nas quais os leitões são alimentados com dietas de alta digestibilidade. Em função do baixo consumo é provável que os leitões experimentem um período de balanço energético negativo nos primeiros dias pós- desmama.

Outras estratégias nutricionais, como manipulação de níveis nutricionais das dietas e introdução de programas alimentares alternativos, por exemplo, também podem colaborar para reduzir o impacto do desmame precoce na saúde e desempenho dos leitões. A diversidade da

dieta (disponibilizar mais de um tipo de dieta conjuntamente) pode estimular a curiosidade e o consumo, pois aumenta a proporção de suínos que ingerem ração em comparação aos alimentados com apenas uma dieta (MIDDELKOOP et al., 2018).

Baseado nas evidências de que a oferta simultânea de duas dietas pode estimular o consumo de leitões lactentes, é possível supor que a aplicação dessa estratégia na primeira semana de creche também possa resultar em benefícios aos animais. Como enfatizado anteriormente, o consumo de ração no período de transição pós-desmame exerce grande influência na adaptação dos leitões e na capacidade de enfrentar os diferentes desafios que ocorrem nessa fase.

3- ARTIGO I - PIGLETS' GUT MICROBIOTA DYNAMICS

Artigo publicado na revista CAB-Reviews - Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources (DOI: 10.1079/PAVSNNR202116048).

Piglets' gut microbiota dynamics

Daniela R. Klein^{1*}, Luciane I. Schneider¹, Júlia C. da Silva¹, Carlos A.R. Rossi² and Vladimir de Oliveira¹

Address: ¹Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, RS 97105-000, Brazil

²Department of Large Animal Clinic, Federal University of Santa Maria, RS 97105-000, Brazil.

ORCID information: Daniela R. Klein (0000-0002-0429-8268) Luciane I. Schneider (orcid: 0000-0002-8542-6937); Júlia C. da Silva (orcid: 0000-0001-8178-2259); Vladimir de Oliveira (orcid: 0000-0002-9292-8943)

***Correspondence author:** Daniela R. Klein. Email: daniela.klein@acad.ufsm.br

Received: 23 June 2021

Accepted: 1 July 2021

doi: 10.1079/PAVSNNR202116048

The electronic version of this article is the definitive one. It is located here: <http://www.cabi.org/cabreviews>

© CAB International 2021 (Online ISSN 1749-8848).

Abstract

The gut microbiota has been a subject of great interest in recent years because the composition and diversity are associated with the maintenance of piglets' health and welfare. This review aims to summarise the composition and diversity of piglet microbiome, the impact on health maintenance, influence of feed and nutrients, impact of stress situations, and the effect of growth promoters and antimicrobials on gut microbiota. The composition and diversity of microbiota are influenced by animal early experiences, the appropriate development of microbiota is essential for intestinal function, and influence animal health, growth and productivity. Interactions between the gut microbiota and the immune system help maintain epithelial barrier, and protect from post-weaning diarrhoea pathogenies. After weaning, the piglets' diet changes abruptly, affecting the microbiota and the physiology, but this can be modulated through nutrients such as fibre, protein and minerals. Stress situations contribute to the appearance of intestinal disorders, possibly changing the microbiota and epithelial cell structure, facilitating colonisation of pathogenic bacteria, decreased performance and increase the use of antimicrobials. In swine production, growth promoters and antibiotics are used to reduce mortality and morbidity, especially in weaning piglets, reducing and controlling potential pathogenic bacteria, resulting in more feed intake and body weight. Antimicrobial use reduces the entire gut microbial population; the replacers are probiotics, prebiotics and organic acids, which helps maintain intestinal microbial populations, and inhibits pathogenic bacteria development. Knowing the animal microbiome dynamics helps improve immunity, productive performance and welfare, and also reduce the use of antimicrobials in animal production.

Keywords: antimicrobial, bacteria, gut, health, immunity, nutrition, metagenomic

Review Methodology: For this review study, we performed systematic searches of scientific manuscripts focussed on piglets' gut microbiota. We searched academic databases, such as Periódicos Capes, Science Direct, and Google Scholar. We searched for terms, such as piglets' gut microbiota, piglets' intestinal microbiota, weaning piglets' microbiota, piglets' gut microbiota and immunity, piglets' gut microbiota and nutrition, microbiota and growth promoters, microbiota and antimicrobials, among others.

Introduction

Gut microbiota has been a subject of great interest in recent years; the composition and diversity are closely linked to physiological responses to diseases and environmental challenges [1]. In the mammals, gut lives from 500 to 1000 species of bacteria, and may contain more than 100 times the number of own cells [2]. Therefore, the microbiota is defined as the set of

microorganisms that maintain a symbiotic relationship with their host, including the relation between microbial cells and animal cells and systems.

The study of the gut microbiota, mainly by human medicine, has shown its importance in health maintenance

processes. Gut microbiota is very relevant in the study of diseases such as obesity, which can be determined by the species in population, that is, bacteria can determine the metabolic results of dietary nutrients [3, 4]. The balance of the bacterial relationship in the human gut also makes it difficult for autoimmune diseases, such as lupus [5], and even neurological diseases such as depression [6].

A better understanding of the complex dynamics of the gut microbiota provides important information to increase productivity in farm animals. The advent of modern genomic technologies, like genomic sequencing using 16S rRNA, has profoundly expanded the knowledge and possibilities of understanding the mechanisms of swine gut microbiota [7]. The characterisation of the microbial structure and functional capacities of the early-life piglet intestinal microbiome are potential biomarkers and therapeutic targets for the prevention of post-weaning infections and improved productivity [2, 7].

The richness of bacterial species in microbiota characterises the gut microbiota of healthy individuals [8]. The contribution of gut microbiota to swine health and performance includes nutrient metabolism, immune response stimulation, pathogen protection and epithelial cell proliferation. For example, a decrease of short-chain fatty acid-producing bacteria abundance, or changes in the relative abundances of genus *Lactobacillus* and *Prevotella*, after a virus infection on piglets, affect the transport and metabolism of carbohydrates, amino acids and lipids, and reduce defence mechanisms [9, 10]. More diversity in gut microbiota can increase body weight gain in weaned piglets, Han *et al.* [11] demonstrate that heavier animals had more microbial richness when compared to the lighter. The microbiome is important in nutrition because most bacteria live in the gut, especially in the colon [12]. The nutrients to maintain the bacteria pool come from undigested and partially digested foods, which the bacteria transform into new molecules. In humans, for example, a more diverse diet results in more diverse and stable microbiota [13]. In weaning piglets, more feed options can improve the voluntary feed intake and increase the welfare, by stimulate the curiosity, which is a natural characteristic of pigs.

The microbiota matures with age and becomes more stable [14]. In piglets the weaning is a very stressful period, because the sow separation, adaptation in a new environment, litter mixture, and a dramatic change in food form [15]. This intense stress affects the microbiota, favouring the development of pathogenic bacteria, increasing the susceptibility of post-weaning diarrhoea [16], and damaged and reduced gut villi and crypts [17, 18]. The pathogenic species are controlled by the prophylactic use of antibiotics and feed growth promoters, but these substances are banned in several countries around the world, improving the importance to control and maintain the animal gut microbiota [19].

The studies focussed on the intestinal microbiome of swine show that microbiota interactions with diet or

stress situations are very complex [20], and dependent on the composition of the intestinal bacterial population. Investigating the microbiome can help the animal nutrition industry reduce the use of antibiotics and growth promoters on feed. This review aims to summarise the composition and diversity of piglet microbiome, the impact on health maintenance, influence of feed and nutrients, impact of stress situations and the effect of growth promoters and antimicrobials on gut microbiota.

The development and composition of piglet gut microbiota

The development of the digestive tract, and gut microbiota depend on animal early experiences. During the birth, piglets are exposed to a variety of bacteria in the vagina and faecal contamination from sow or environment [2]. The composition of the gut microbiota is not static and changes over time [21], and many factors contribute to this change, including physiological changes in the gut and, solid feed intake [22]. The appropriate development of microbiota is essential for intestinal function, and will influence animal health, growth and productivity, including reducing the incidence of infections, inflammatory and other immune diseases [23].

The intestinal microbiota plays an important role in digestion; bacteria colonise the mucosa epithelia by binding with the epithelial cells or in the mucus layers present at the villi base [24]. The composition of the microbiota changes according to the gastrointestinal tract area [2]. In pigs, the largest bacteria populations and more diverse microbiota are present in the large intestine, because fermentation processes, but some species are also present in the stomach and small intestine. The stomach of pigs has very low microbial activity due to the low pH, but the genus *Lactobacilli* and *Streptococci* can adhere and colonise the surface, especially in young pigs [24]. The small intestine is being composed of three parts: duodenum, jejunum and ileum, and is where the enzymes act and the nutrients are absorbed by the large presence of villi. And the large intestine comprises the colon and cecum, where cellulose and hemicellulose are partially degraded by the large microbial population [24].

The predominant phyla in gut microbiota of the small intestine and large intestine are opposite (Fig. 1a). According to Zhao *et al.* [14], using samples of intestinal segments' content of 6-month-old pigs, the jejunum is composed mainly of the phylum Proteobacteria (79.5%) and Firmicutes (18.7%), and the ileum of Proteobacteria (72.6%) and increases Firmicutes (25.7%). However, in cecum, predominant phyla are Firmicutes (80.2%) and Proteobacteria (12.7%), and in colon Firmicutes (76.4%), Proteobacteria (13.2%) and Bacteroidetes (8.5%).

The relative quantifications of the phylum gut microbiota composition from faecal samples of piglets in different ages (Fig. 1b) were compared in studies of Zhao *et al.* [14] and

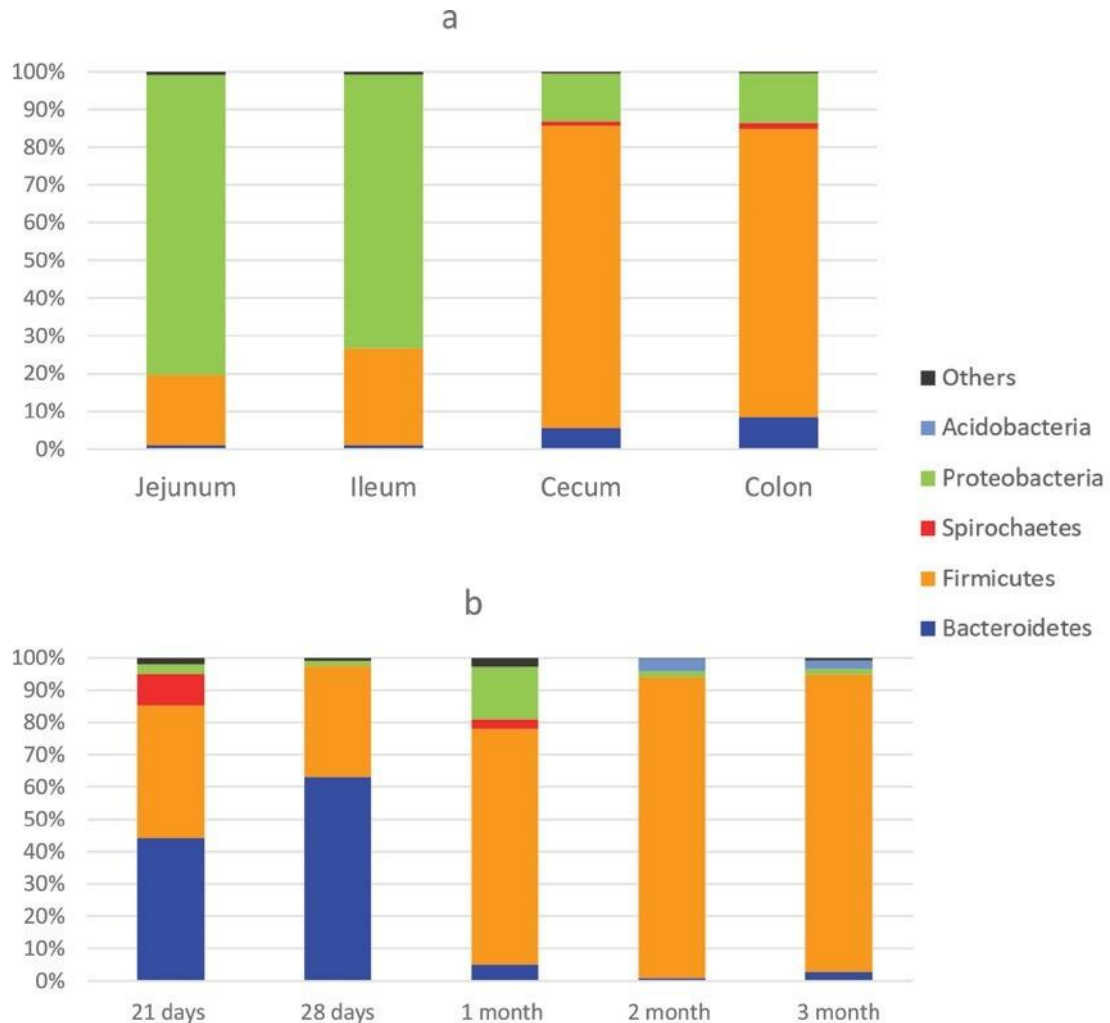


Figure 1. Quantification of piglet gut microbiota phylum. a, Microbiota composition in different gastrointestinal segments. b, Microbiota composition in faeces at different ages. Adapted from Zhao et al. [14] and Guevarra et al. [16].

Guevarra et al. [16]. Younger pigs have a more diverse microbiota; after weaning and the introduction of solid and plant-based feed, the microbiota becomes more stable and less diverse. The predominant phylum in nursing piglets (21 days old) are Bacteroidetes (44.14%), Firmicutes (41.01%), Spirochetes (9.87%) and Proteobacteria (2.94%); and in weaned piglets (28 days old) are Bacteroidetes (63.14%), Firmicutes (34.27%) and Proteobacteria (1.79%) [16]. At 1 month of age, microbiota is predominating by Firmicutes (73%), Proteobacteria (16.3%) and Bacteroidetes (5%) [14]. At 2 months, feeding with a solid diet formulated basically with plant ingredients, phylum changes Firmicutes (93%), Proteobacteria (1.9%), Bacteroidetes (0.9%) and Acidobacteria (4.1%) [14]. With 3 months old the microbiota remains stable comparing with 2 months, having a slight increase in Firmicutes (2.7%) and a reduction in Acidobacteria (2.8%) [14]. At the genus level, *Prevotella* and *Lactobacillus* were predominant in the weaned piglets; and *Bacteroides* and *Prevotella* in nursing piglets, and *Prevotella* abundance increased from an average of 12.93% in nursing piglets to

57.24% in weaned piglets [16]. The early development and diversity of the microbiota improves the development of immune system and health of piglets, but little information is still available with respect to the structure and function of gut microbiota in piglets.

The influence of feed and nutrients on gut microbiota composition

The gut microbiome can synthesise, modulate and degrade a large number of small molecules, providing functional complementation to host metabolism. The microbiota can metabolise dietary components that cannot be metabolised by the host, such as complex carbohydrates [20]. Besides, the microbiota contributes to the production of primary metabolites and modulation of secondary metabolites that affect host physiology in multiple ways. Several of these microbial metabolic pathways have been linked to host physiology, including the production of fatty acids, vitamins, neuroactive and amino acid metabolites, immune cell development, neuronal regulation and nutrient digestion [25].

After weaning, the piglets' diet changes abruptly, from a milk-based feed, rich in fat and poor in carbohydrate, to a feed using mostly plant-based products with high levels of carbohydrate and low levels of fat. This change may reduce proliferation of intestinal epithelial cells [26] and trigger the succession process of gut bacteria [27]. The composition and functional capacity of the microbiota change, and start the hydrolyse of non-starch polysaccharides, such as xylose and mannose, which are found because of the inclusion of vegetal ingredients on feed [28]. The microbiome of nursing piglets has a significant enrichment of the Bacteroides family, associated with the absorption and utilisation of lactose and galactose [29, 30].

The greater abundance of the Bacteroides bacteria family during nursing is because of milk monosaccharides and oligosaccharides. And change to a greater abundance of Prevotellaceae after weaning is because of hemicelluloses in plant-based feed [31], indicating an adaptation to the different diet composition after weaning [32]. Changes in the amounts between phylum and family at weaning are the result of a combination of multiple factors, such as the feed chemical composition, the change to a solid diet, the stress of separation from mother and litter, adaptation to a new environment and other physiological factors [32].

After weaning the *Prevotella* genus has significant increases, because of the fermentation of vegetal non-starch polysaccharides to short-chain fatty acids [33]. In humans, species of *Prevotella* spp. produce enzymes such as β -glucanase, manase and xylanase, which can degrade polysaccharides in the plant cell wall [34]. For example, one of the biggest changes observed is in a *Prevotella* population that has been present in piglets since birth, with a low population which increases rapidly when a more favourable diet is introduced after weaning [30].

The relative abundance of *Lactobacillus* also increased in weaned piglets. Lactobacilli have recently been identified as bacteria with the ability to consume vegetal monosaccharides and disaccharides, as well as simple milk sugars such as lactose, but do not consume complex milk sugars [35]. This genus is recognised by carbohydrate-using bacteria, associated with carbohydrate transport and utilisation [36]. With weaning, bacterial populations such as family Prevotellaceae increased from less than 0.3% to over 15% total, contributing to the concomitant decrease in Bacteroidaceae [30].

Studies suggest that gut microbiota can also be modulated through dietary nutrients, such as fibre, protein and minerals. Generally, fibrous components are fermented by fibre-degrading bacteria in the large intestine, resulting in the production of short-chain fatty acids, like propionate and butyrate. In nursing piglets' diet, a moderate increase of fibre with alfalfa, which is rich in insoluble fibre (cellulose) and also soluble fibre (pectin), increased the levels of propionate, which is beneficial for gut microbiota [37]. A supplementation with grape seed proanthocyanidin had increased propionate production and regulated the gut microbiota, especially reducing Firmicutes and increasing

Bacteroidetes, and improved the lipid metabolism [38]. Diets using corn bran and wheat bran altering gut microbiota and improving butyrate production [39], increasing the proliferation and differentiation of mucosal epithelial cells [11].

Variation in the dietary protein may also benefit the intestinal microbiota of piglets. A moderate reduction of dietary protein concentration increased the proliferation of benign bacteria in the piglet large intestine, and enhanced the ileal barrier function [40, 41]. In contrast, a reduction of dietary protein to 10% of crude protein affects negatively the gut microbiota, ileal morphology and intestinal cell proliferation [41]. Reduced dietary protein in a short period after weaning can reduce post-weaning diarrhoea, but this can compromise the animal performance [42]. In other study, a low protein diet (173 g CP/kg) supplemented with an ideal amino acid pattern reduced post-weaning diarrhoea without affecting production [43]. By other side, the excess of protein for degradation, mainly in the large intestine, results in additional metabolites, such as branched-chain fatty acids (BCFA), but also potentially toxic products including ammonia, amines and phenols, from deamination of amino acids by *Bacteroides* spp., *Propionibacterium* spp. and *Streptococcus* and *Clostridium* species [40].

Zinc oxide has known antibacterial properties, and its application at high concentrations in weaned piglet diets has great effects on gut microbiota development, affecting composition and metabolic activity [44]. The action power of zinc oxide to reduce diarrhoea and mortality is still unclear, and it is speculated that high levels of zinc inhibit the growth of pathogenic microorganisms in piglets' intestine. On the other side, uses of high concentration of zinc oxide in diets result in a great environment risk; a series of countries, such as European Union member states and China, have imposed strict restrictions on high levels of this substance.

Feed and the ingredients used in piglets' diets affect the gut microbiota, reinforcing the importance of early development and diversity. Despite promising results, more studies are needed to understand the interactions and mechanisms involved between diet composition and the composition of piglet intestinal microbiota.

Impact of stress situations on gut microbiota

Piglets' early weaning contributes to the appearance of intestinal disorders, which are the main cause of decreased growth performance and prophylactic use of antibiotics [45]. Diarrhoea in weaned piglets is mainly caused by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*, which attach in the digestive tract due to microbial imbalance caused by feeding changes and transport stress.

Typical weaning stress leads to decreased villus height and a persistent inflammatory process, possibly due to changes in microbiota and epithelial cell structure,

facilitating colonisation of pathogenic bacteria [46]. Weaning causes intestinal barrier deterioration due to chronically elevated stress hormones and reduced feed intake [47, 48].

Recent studies have also shown that heat stress can trigger changes in gut [49, 50]. Exposure to thermal stress increases intestinal damage due to bowel ischemia and hypoxia, resulting in greater permeability and morphological changes such as reduced villus height and crypt depth [51]. The production of mucus lubricates the intestines and prevents bacterial adhesion that can activate the immune system and cause inflammation [52]. However, stressors such as weaning, malnutrition and infection may reduce goblet cell counts in the villi leading to an impaired mucus layer and increased susceptibility to infection. These results suggest that one of the mechanisms of heat stress is increased intestinal permeability as well as immune and metabolic dysfunction [53].

Impact of growth promoters and antimicrobials on the gut microbiota

Today the conscious use of antibiotics is one of the most important discussions that will impact world meat production in the coming years. The use of molecules is shared between veterinary and human, which can develop antibiotic-resistant bacterial strains, which can become a serious public health problem, as well as residues in meat products and animal faeces [7].

Many developed countries, most in European Union, do not allow the use of antibiotics as growth promoters. The use of antibiotics at therapeutic levels for a short period of time, or sub-therapeutic levels over a prolonged period, increases the number of antibiotic-resistant bacteria in the gastrointestinal tract [54].

In swine farming, growth promoting antibiotics are used to reduce mortality and morbidity, especially in weaning piglets, improving performance and reducing production costs. Its action is through modulation of the intestinal microbiota, reducing and controlling the growth of potential pathogenic bacteria, and healthy animals consume more feed and gain more weight, improving performance [55].

Antibiotic use reduces the entire gastrointestinal microbial population, and many species of bacteria are harmless and essential for intestinal health. The challenge is to find products that favour beneficial bacteria, such as probiotics, prebiotics and organic acids, which replace the use of antimicrobials as growth promoters.

The use of alternatives to antibiotics, such as prebiotics and probiotics, has shown beneficial effects, such as the production of antimicrobial substances, inhibition of digestive diseases, increased balance of microbial population in the gut and increased animal performance [2].

The probiotic action mechanisms include production of substances that promote host immunity, competitive exclusion of pathogenic bacteria and modulation of the

intestinal microbiota [56]. Lactobacilli are members of lactic acid bacteria and help shape the composition of the intestinal microbiota. *Lactobacillus salivarius*, which produces the bacteriocin Abp118, has been tested on pigs from 6 to 10 weeks of age and has decreased the relative proportion of bacteria in the phylum Spirochaetes [57].

Another alternative to the use of antibiotics is prebiotics, food substances that are not digestible to the animal organism and serve as a nutrient for the beneficial microorganisms present in the gastrointestinal tract. The use of fructooligosaccharide diet for piglets after weaning resulted in reduced diarrhoea incidence, enterotoxigenic *E. coli* concentration and mortality, and thus improved performance [58].

Symbiotic use of prebiotics and probiotics helps to manipulate intestinal microbial populations, lowering luminal pH and stimulating the immune system, leading to the production of antimicrobial substances inhibiting the development of pathogenic bacteria [7]. Many studies suggest that probiotics, prebiotics and their symbiotic combination exert beneficial effects on piglets by modulating the intestinal microbiota, but some studies have not reported effects of supplementation on the gut bacterial population [59, 60].

Due to the necessary restrictions on prophylactic use of antimicrobials in diets, especially for piglets, it is necessary to find more substitute alternatives and clarify the action mechanisms from prebiotics and probiotics.

Relation of intestinal microbiota in piglet health maintenance

Interactions between the gut microbiota and the host immune system begin at birth. Microbiota shapes the development of the immune system, which helps maintain a stable microbial population [20, 25], normal functions and permeability of the intestinal villi, regulate immune responses and protect from pathogenic bacteria [61]. Thus, the weaning period is a crucial stage in pig life, as the gut microbiota composition and the immune system are underdeveloped, making piglets susceptible to pathogens [62, 63], like enterotoxigenic *E. coli*, *Cystoisospora suis*, *Clostridium perfringens* types A and C and rotavirus, leading to post-weaning diarrhoea.

The immune system must learn to differentiate between benign and pathogenic microorganisms, and develop a response memory. Innate immune cells are preprogrammed and are always available as the first line of defence, regardless of prior exposure to bacterial antigens, so they are extremely important early in life when the acquired immune system is developing [30]. Bacterial adherence in the intestinal mucosa is necessary for its multiplication and colonisation, but it may also start the establishment of infectious diseases [24].

The weaning stress causes a gut microbiota imbalance by a decrease in the representation of anaerobic bacteria,

and an increased relative abundance of facultative anaerobic bacteria such as members of Enterobacteriaceae, taxonomic family to which belong enterotoxigenic *E. coli* [64]. The anaerobic bacteria balance is important for preserving intestinal mucosal immunity, limits access to intestinal epithelium, protecting and contributing to the maintenance of the epithelial barrier, and integrity of epithelial cells [25, 65]. This gut microbiota imbalance in post-weaning piglets characterises a dysbiosis. The process leading to dysbiosis and gastrointestinal infections is, at this moment, poorly documented in piglets [62].

There are several hypotheses for explaining weaning dysbiosis, like the decrease in gut microbial diversity affects the mucous membrane glycans, which protect the gut epithelium from pathogenic microorganisms [66]. Other is an increase in intestinal permeability; the intestine uses diffusion, passive, active and endocytosis mechanisms to limit the entry of toxins and antigens and allow absorption of nutrients and water [67]. Tight junctions make the greatest selective regulation of permeability during the diffusion mechanism [68]. With gut permeability damage, the infection by enterotoxigenic bacteria like *E. coli* (adherence on enterocytes and releasing enterotoxins on the cells) or *Clostridium perfringens* (anaerobic bacteria which uses starch and lactose and produces two toxins: enterotoxin A which contributes to diarrhoea, and C causes intestinal haemorrhage and death). Or also by protozoan *Cystoisospora suis* (the digestion process activates sporozoites which enter to the enterocytes) or by virus Rotavirus (virus enters the enterocyte and impacts the osmosis) is facilitated.

Also, the feed change and the stresses occurring at weaning promote intestinal inflammation and increase the concentration of oxygen and gut host-response producing nitric oxide, which intestinal lumen is rapidly transformed into nitrate facilitating the growth of enterotoxigenic strains of *E. coli* [69]. Wei *et al.* [70] in a study with piglets reported an increased concentration of reactive oxygen species in the intestine coupled with an expansion of the *E. coli* population one week after weaning.

Early exposure of the gastrointestinal tract to a variety of bacteria by feed or environment is important for the immunity development. However, some components are dynamic, biologically and metabolically flexible, varying according to environmental stresses or feed changes, altering the composition of microbiome species that may influence health maintenance [71].

Final considerations

The composition and diversity of piglets' gut microbiota are still being established, but the influence on health, nutrition, and performance of the animals are known. Maintaining a healthy microbiota helps reducing diarrhoea and increases the performance in weaning piglets. Modulating the microbiota by feed shows promising

results, but further studies are needed to understand the interactions and mechanisms involved between diet composition and the composition of piglet gut microbiota. Knowing the animal microbiome dynamics helps improve immunity to infections, productive performance, and welfare, and may also reduce the use of antimicrobials in animal production.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- Larsen OF, Claassen E. The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. *Scientific Reports* 2018;8(1):1–5.
- Kim HB, Isaacson RE. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology* 2015;177(3–4):242–51.
- Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology* 2010;26(1):5–11.
- Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut microbiome and obesity: A plausible explanation for obesity. *Current Obesity Reports* 2015;4(2):250–61.
- Zhang H, Liao X, Sparks JB, Luo XM. Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus. *Applied and Environmental Microbiology* 2014;80(24):7551–60.
- Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R, *et al.* Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology & Motility* 2014;26(8):1155–62.
- Guevarra RB, Lee JH, Lee SH, Seok MJ, Kim DW, Kang BN, *et al.* Piglet gut microbial shifts early in life: Causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2019;10(1):1–10.
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;500:541–6.
- Huang MZ, Wang SY, Wang H, Cui DA, Yang YJ, Liu XW, *et al.* Differences in the intestinal microbiota between uninfected piglets and piglets infected with porcine epidemic diarrhoea virus. *PLoS One* 2018;13:e192992.
- Huang A, Cai R, Wang Q, Shi L, Li C, Yan H. Dynamic change of gut microbiota during porcine epidemic diarrhoea virus infection in suckling piglets. *Frontiers in Microbiology* 2019;10:322.
- Han GG, Lee JY, Jin GD, Park J, Choi YH, Chae BJ, *et al.* Evaluating the association between body weight and the intestinal microbiota of weaned piglets via 16S rRNA sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017;101(14):5903–11.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacterial cells in the body. *PLoS Biology* 2016;14(8):e1002533.

13. Heiman ML, Greenway FL. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *MolecularMetabolism* 2016;5(5):317–20.
14. Zhao W, Wang Y, Liu S, Huang J, Zhai Z, He C, et al. The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PLoS One* 2015;10(2):e0117441.
15. Fowler V, Gill B. Voluntary food intake in the young pig. *BSAP Occasional Publication* 1989;13:51–60.
16. Guevarra RB, Hong SH, Cho JH, Kim BR, Shin J, Lee JH, et al. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2018;9(1):1–9.
17. Johnson JS, Sapkota A, Lay Jr DC. Rapid cooling after acute hyperthermia alters intestinal morphology and increases the systemic inflammatory response in pigs. *Journal of Applied Physiology* 2016;120:1249–59.
18. Johnson JS, Aardsma MA, Duttlinger AW, Kpodo KR. Early life thermal stress: Impact on future thermotolerance, stress response, behavior, and intestinal morphology in piglets exposed to a heat stress challenge during simulated transport. *Journal of Animal Science* 2018;96(5):1640–53.
19. Vahtovuori J, Korkeamäki M, Munukka E, Hämeenoja P, Vuorenmaa J. Microbial balance index-A view on the intestinal microbiota. *Livestock Science* 2007;109:174–8.
20. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host–gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012;336:1262–7.
21. Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier G, Denis C, et al. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports* 2015;7(3):554–69.
22. Palmer C, Bik EM, Di Giulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology* 2007;5:e177.
23. Schokker D, Zhang J, Zhang LL, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, et al. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS One* 2014;9:e100040.
24. Ewing WN. *The living gut*. 2nd ed. Nottingham, UK: Nottingham University Press; 2009.
25. Levy M, Blacher E, Elinav E. Microbiome, metabolites and host immunity. *Current Opinion in Microbiology* 2017;35:8–15.
26. Yang H, Xiong X, Wang X, Li T, Yin Y. Effects of weaning on intestinal crypt epithelial cells in piglets. *Scientific Reports* 2016;6(1):1–11.
27. Bian G, Ma S, Zhu Z, Su Y, Zoetendal EG, Mackie R, et al. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environmental Microbiology* 2016;18(5):1566–77.
28. Tan Z, Yang T, Wang Y, Xing K, Zhang F, Zhao X, et al. Metagenomic analysis of Cecal microbiome identified microbiota and functional capacities associated with feed efficiency in landrace finishing pigs. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:1546.
29. Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, Pudlo N, Martens EC, Desai P, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host & Microbe* 2011;10(5):507–14.
30. Frese SA, Parker K, Calvert CC, Mills DA. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 2015;3(1):1–10.
31. Lamendella R, Santo Domingo JW, Ghosh S, Martinson J, Oerther DB. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology* 2011;11(1):1–17.
32. Pajarillo EAB, Chae JP, Balolong MP, Kim HB, Kang DK. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2014;60(4):140–6.
33. Ivarsson E, Roos S, Liu HY, Lindberg JE. Fermentable non-starch polysaccharides increases the abundance of Bacteroides–Prevotella–Porphyromonas in ileal microbial community of growing pigs. *Animal* 2014;8(11):1777–87.
34. Flint HJ, Bayer EA. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1125:280–8.
35. Schwab C, Ganzle M. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters* 2011;315:141–8.
36. Cai H, Thompson R, Budinich MF, Broadbent JR, Steele JL. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: Insights into their niche-associated evolution. *Genome Biology and Evolution* 2009;1:239–57.
37. Zhang L, Mu C, He X, Su Y, Mao S, Zhang J, et al. Effects of dietary fibre source on microbiota composition in the large intestine of suckling piglets. *FEMS Microbiology Letters* 2016;363(14):fnw138.
38. Wu Y, Ma N, Song P, He T, Levesque C, Bai Y, et al. Grape seed proanthocyanidin affects lipid metabolism via changing gut microflora and enhancing propionate production in weaned pigs. *The Journal of Nutrition* 2019;149(9):1523–32.
39. Zhao J, Liu P, Wu Y, Guo P, Liu L, Ma N, et al. Dietary fiber increases butyrate-producing bacteria and improves the growth performance of weaned piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018;66(30):7995–8004.
40. Rist VT, Weiss E, Sauer N, Mosenthin R, Eklund M. Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets. *Anaerobe* 2014;25:72–9.
41. Fan P, Liu P, Song P, Chen X, Ma X. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Scientific Reports* 2017;7(1):1–12.
42. Halas D, Heo JM, Hansen CF, Kim JC, Hampson DJ, Mullan BP, et al. Organic acids, prebiotics and protein level as dietary tools to control the weaning transition and reduce post-weaning diarrhoea in piglets. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2007;2(079):1–13.
43. Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ, Pluske JR. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. *Archives of Animal Nutrition* 2008;62(5):343–58.
44. Starke IC, Pieper R, Neumann K, Zentek J, Vahjen W. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the

- intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiology Ecology* 2014;87(2):416–27.
45. Furbeyre H, van Milgen J, Mener T, Gloaguen M, Labussière E. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. *Animal* 2017;11(2):183–92.
 46. Burkholder KM, Thompson KL, Einstein ME, Applegate TJ, Patterson JA. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. *Poultry Science*, 2008;87(9):1734–41.
 47. Smith F, Clark JE, Overman BL, Tozel CC, Huang JH, Rivier JE, et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010;298(3):G352–63.
 48. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2013;4(1):1–4.
 49. Alhenaky A, Abdelqader A, Abuajamieh M, Al-Fataftah AR. The effect of heat stress on intestinal integrity and *Salmonella* invasion in broiler birds. *Journal of Thermal Biology* 2017;70:9–14.
 50. Wu QJ, Liu N, Wu XH, Wang GY, Lin L. Glutamine alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, intestinal inflammatory response, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science* 2018;97(8):2675–83.
 51. Pearce SC, Mani V, Weber TE, Rhoads RP, Patience JF, Baumgard LH, et al. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *Journal of Animal Science* 2013;91(11):5183–93.
 52. Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2013;10(6):352.
 53. Shi D, Bai L, Qu Q, Zhou S, Yang M, Guo S, et al. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poultry Science* 2019;98(6):2405–13.
 54. Garcia-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 2014;170(1–2):1–9.
 55. Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, et al. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(38):15485–90.
 56. Cammarota G, Janiro G, Bibbo S, Gasbarrini A. Gut microbiota modulation: Probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?. *Internal and Emergency Medicine* 2014;9(4):365–73.
 57. Riboulet-Bisson E, Sturme MH, Jeffery IB, O'Donnell MM, Neville BA, Forde BM, et al. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PLoS One* 2012;7(2):e31113.
 58. Zhao PY, Jung JH, Kim IH. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 2012;90(3):833–9.
 59. Kenny M, Smidt H, Mengheri E, Miller B. Probiotics—do they have a role in the pig industry?. *Animal* 2011;5(3):462–70.
 60. Upadrasta A, O'Sullivan L, O'Sullivan O, Sexton N, Lawlor PG, Hill C, et al. The effect of dietary supplementation with spent cider yeast on the swine distal gut microbiome. *PLoS One* 2013;8(10):e75714.
 61. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 2013;13(5):321–35.
 62. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury, MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: Understanding the keys to health. *Trends in Microbiology* 2017;25:851–73.
 63. Niederwerder MC, Jaing CJ, Thissen JB, Cino-Ozuna AG, McLoughlin KS, Rowland RR. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following coinfection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology* 2016;188:1–11.
 64. Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Kestra AM, et al. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science* 2013;339:708–11.
 65. Kaiko GE, Ryu SH, Koues OI, Collins PL, Solnica-Krezel L, Pearce EJ, et al. The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell* 2016;165:1708–20.
 66. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016;535(7610):85–93.
 67. Wjitten PJ, van der Meulen J, Verstegen MW. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: A review. *British Journal of Nutrition* 2011;105(79):967–81.
 68. Ahmad R, Rah B, Bastola D, Dhawan P, Singh AB. Obesity induces organ and tissue specific tight junction restructuring and barrier deregulation by claudin switching. *Scientific Reports* 2017;7(1):1–16.
 69. Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology* 2017;10(1):18–26.
 70. Wei HK, Xue HX, Zhou ZX, Peng J. 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* 2017;11(2):193–201.
 71. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* 2012;148(6):1258–70.

**4- ARTIGO II - PERFORMANCE, INTESTINAL MORPHOLOGY AND
BEHAVIOR OF WEANED PIGLETS SUPPLEMENTED WITH
MILK REPLACER**

Artigo submetido à revista "Animal Production Science" (ISSN 1836-5787).

**Performance, intestinal morphology and behavior of weaned piglets
supplemented with milk replacer**

Daniela Regina Klein^{A*}, Marcos Martinez do Vale^B, Sílvio Teixeira da Costa^C,
Marcos Speroni Ceron^D, Anderson Borba^A, Arlei Rodrigues Bonet De Quadros^A,
Vladimir de Oliveira^A

^A Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, Brazil.

^B Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, Brazil.

^C Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, Brazil.

^D *Departamento de Agronomia, Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas, MG, Brazil.*

* Corresponding author: Daniela Regina Klein. E-mail: daniela.klein@acad.ufsm.br

Short title: **Performance, intestinal morphology and behavior of weaned piglets
supplemented with milk replacer**

Performance, intestinal morphology and behavior of weaned piglets supplemented with milk replacer

Summary text for the Table of Contents

At weaning the piglets are subjected to nutritional, environmental and social stress, which affect productive performance and increased susceptibility to diseases. The supply of a milk replacer in post-weaning not affect performance, diarrhea index and behavior, therefore the duodenum villus are longer and Peyer's patches larger, indicating increase in immune activity. Thus, feed the newly weaned piglets with a milk replacer can contribute to start feed intake faster, promote health and welfare.

Performance, intestinal morphology and behavior of weaned piglets supplemented with milk replacer

Abstract

Context: In the post-weaning piglets are exposed to nutritional, environmental and social stress, affecting negatively the gut health and the performance, which can be minimized with faster feed intake on the nursery.

Aims: This study aimed to evaluate the effect of offering a milk replacer on performance, diarrhea incidence, intestinal histology and behavior in newly weaned piglets.

Methods: Two experiments were conducted: the first study used piglets weaned at an average age of 30 days and an average weight of 9.40 kg; and the second experiment used piglets weaned at 21 days and an average weight of 6.88 kg. The animals were distributed in a completely randomized design with two treatments: F – pre-starter I diet; and F+MR – pre-starter I diet + milk replacer. Daily feed intake (DFI), average daily weight gain (ADG), and feed conversion ratio (FCR) were measured at zero, 3, 7, 14, 21, and 28 days (and 35 days in the second experiment) after weaning. The daily feed intake was measured from day 1 to 14 after weaning (Experiment 1), and from day 1 to day 7 (Experiment 2). The diarrhea index was calculated in both experiments. In Experiment 1, gut samples were collected for morphological analyses. For the behavior analysis in Experiment 1, the animals were observed for 2 h per day on days 1, 4, 6, 9 and 12 after weaning.

Key results: The supply of a milk replacer in post-weaning piglets did not affect performance, diarrhea index or behavior. Feed intake showed linear growth until 2 weeks after weaning, and piglets supplemented with milk replacer had greater feed

intake on the second and third post-weaning days. Piglets fed milk replacer had a greater duodenum villus length and larger Peyer's patches.

Conclusions: The supplementation with a milk replacer in weaned piglets did not affect performance, diarrhea and behavior, however increase feed intake on first post-weaning days, and increase gut immune activity.

Implications: Our study suggests that a supplementation with a milk replacer on the first 3 or 4 days after weaning can help stimulate faster feed intake and improve gut health in piglets.

Keywords: Gut health, Lactose, Microbiota, Piglets feed intake, Post-weaning, Swine production, Weaning, Welfare

Introduction

At weaning, piglets are subjected to nutritional, environmental and social stress (Pluske *et al.*, 1996). These stressors result in low growth rates and changes in gut morphology, which affect productive performance and increase susceptibility to diseases. Changes may occur in small intestine cell structure, such as villous atrophy and crypt hyperplasia, and in cellular epithelium mitosis rate (Pluske, 2001).

Furthermore, early weaned piglets find it more difficult to acidify the gastric contents, which can increase the proliferation of pathogenic bacteria (Lallès *et al.*, 2007) and decrease the digestive and absorptive capacity, resulting in post-weaning diarrhea.

The piglet diet post-weaning abruptly changes from high fat and low carbohydrate milk to a solid high carbohydrate and low fat diet. This can reduce intestinal epithelial cell proliferation and intestinal dysbiosis (Gresse *et al.*, 2017). So, quickly starting feed intake after weaning is essential to maintain the intestinal

structure and performance of piglets and reduce antibiotic use. Feeding two diets simultaneously can contribute to this end. In addition, having the opportunity to select their diet can restore, at least partially, the pigs' innate exploratory behavior and reduce post-weaning stress, contributing to their welfare in the post-weaning period.

Several nutritional methods have been studied to minimize weaning losses, some of which have been widely implemented in practice, such as feeding high lactose post-weaning diets. Lactose is a milk disaccharide and is the main source of carbohydrates of neonatal mammals. Even though endogenous lactase activity in pigs declines before weaning, its use after weaning should be considered as it facilitates post-weaning adaptation, improving gut health and metabolism (Zeng *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Milk replacers, which are usually offered during the maternity phase to supplement feeding and help adapt the piglets for weaning, are basically composed of bovine milk derivatives (milk powder and whey) and vegetable components (starch, and wheat and soy proteins; Amdi *et al.*, 2021). However, a considerable number of piglets do not eat solid or liquid feed before weaning (Bruininx *et al.*, 2002), and thus the supplementation of dairy substitutes in the post-weaning period helps their adaptation, facilitating feed intake and improving performance.

Supplementing or providing lactose sources, such as milk replacers, can help improve the intestinal health of weaned piglets. The benefits of lactose supplementation after weaning are better digestibility and nutritional quality, which in turn improve performance (Pierce *et al.*, 2006). This study aimed to evaluate the effect of offering a milk replacer on performance, diarrhea incidence, intestinal histology and behavior in newly weaned piglets.

Material and methods

The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM), No. 9669161020, in compliance with Law 11.794 of October 8, 2008, and Decree 6899 of July 15, 2009, as well as the standards issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA-Brazil).

Two experiments were conducted to evaluate the influence of a milk replacer as feed supplement on the first post-weaning days of piglets weaned at 21 and 30 days of age, on their performance, gut health and behavior. The first study used piglets weaned at an average age of 30 days and an average weight of 9.40 kg. As the milk replacer did not influence the performance of these animals, the second experiment used lighter animals i.e. piglets weaned at 21 days and an average weight of 6.88 kg.

Animals and facilities

In Experiment 1, 60 weaned piglets (30 females and 30 males), with an average age of 30 days and an average live weight of 9.4 ± 1.22 kg, were used. The animals were distributed in 20 pens (separated by sex), in a completely randomized design. Each pen measured 1 m² and was equipped with semi-automatic feeders and drinkers. The air temperature and relative humidity were kept at a level to maintain thermic comfort for each age.

In Experiment 2, 60 weaned piglets (30 females and 30 males), with an average age of 21 days and an average live weight of 6.88 ± 0.71 kg, were used. The animals were distributed in 20 pens in the same facilities as in Experiment 1. The air

temperature and relative humidity were kept at a level to maintain thermic comfort for each age.

Treatments

The animals in Experiment 1 were distributed in two treatments: F – pre-starter I diet; and F+MR – pre-starter I diet + milk replacer during the first 3 post-weaning days. Apart from the milk replacer, the feeding program was the same for all animals: pre-starter I (1 to 7 days), pre-starter II (8 to 21 days) and starter (22 to 28 days). The diets and milk replacer composition were formulated according to the NRC recommendations (NRC, 2012; Table 1). Feed and water were available *ad libitum*.

The treatments in Experiment 2 were: F – pre-starter I diet; and F+MR – pre-starter I diet + milk replacer for 4 days after weaning. Apart from the milk replacer, the feeding program was the same for all piglets: pre-starter I (1 to 7 days), pre-starter II (8 to 21 days) and starter (22 to 35 days). Feed and water were available for *ad libitum* intake.

In both experiments, during the period of milk replacer supply, two feeders were provided per pen in each treatment, and after this period one of the feeders was removed from each pen.

General procedures

The animals were fed at 6 am and feed replacement was performed when necessary throughout the day, in order to ensure feed was always available for the piglets. The facilities were cleaned twice a day by scraping the waste out of the pens and washing with water.

Sample collection

The performance variables, daily feed intake (DFI), average daily weight gain (ADG), and feed conversion ratio (FCR), were calculated by quantifying the feed leftovers and weighing the animals at zero, 3, 7, 14, 21, and 28 days (and 35 days in the second experiment) after weaning in both experiments.

In Experiment 1, daily feed intake was measured from day 1 to 14 after weaning, and in Experiment 2 it was measured from day 1 to day 7. The calculation was performed by recording the amount of feed supplied and weighing the leftovers in the feeder daily at 6 pm. The amount of milk replacer consumed daily was also measured during the supply period in each experiment, by recording the amount of feed supplied and weighing the feed trough leftovers at 6 pm.

In both experiments, visual assessment of feces was performed daily in the morning and afternoon for 21 days of the experiment, assigning consistency scores from 1 to 3 for each animal (1 = solid/normal feces, 2 = pasty feces, and 3 = liquid feces). A score of 3 indicated the occurrence of diarrhea. In the periods 1 to 3 and 4 to 7 days post-weaning for Experiment 1, 1 to 4 and 5 to 7 days post-weaning for Experiment 2, and 1 to 7, 8 to 14 and 15 to 21 days post-weaning in both experiments, the diarrhea index was calculated according to the methodology proposed by Pan *et al.* (2017):

$$\text{Diarrhea index (\%)} = \left(\frac{\text{number of animals with diarrhea} \times \text{number of days with diarrhea}}{\text{total number of animals} \times \text{total observation days}} \right) \times 100$$

In Experiment 1, 6 animals from each treatment were slaughtered 8 days after weaning for histological collection of 1-cm portions of the intestine (central portions of the duodenum, jejunum, and ileum) and measurement of intestinal villus length and Peyer's patch sizes (GALT). The samples were collected after slaughter, washed in saline solution and fixed in formalin, for subsequent preparation of slides for analysis under an optical microscope.

Following the slaughter of animals for the histological samples, each pen housed two piglets until the end of the experimental period.

In the behavior analysis in Experiment 1, animals were observed for 2 h per day (1 h between 09:00 and 11:00, and 1 h between 14:00 and 16:00) on days 1, 4, 6, 9 and 12 after weaning (Colson *et al.*, 2006). With the help of monitoring cameras, a trained observer viewed the recorded videos and evaluated the behavior of the animals in each pen every 10 minutes, observing the frequencies of feed and water intake, resting, exploration, belly-nosing and aggression. There was a minimum interval of 15 minutes before starting the observation if the animals had been handled or any management practices had been carried out immediately prior to the behavior analysis.

Statistical analyses

The data on weight, daily feed intake, daily weight gain and feed conversion showed normality according to the Shapiro-Wilk test and homogeneous variances according to the Barlett test. The initial piglet weight was tested as a covariate, but was not significant ($P > 0.05$); likewise sex had no significant effect. Thus, the means of the treatments were compared by Student's t test at the 5% significance level.

Daily feed intake at 14 days post-weaning in Experiment 1, and at 7 days post-weaning in Experiment 2, was analyzed by regression analysis.

Nonparametric Chi-square tests were used to analyze the diarrhea index at the 5% significance level. Similarly, gut morphology data and behavioral measures between treatments were analyzed using the Mann-Whitney U-test at the 5% significance level.

Results

Performance

In Experiment 1, piglets receiving milk replacer had 55% higher intake than piglets in the control group, with most (73%) of this increase due to the consumption of milk replacer (Table 2). However, the increased intake of milk replacer did not translate into weight gain, which was 35% lower in the F+MR piglets. Interestingly, there was no significant correlation between milk replacer intake and ADG (-0.46 between supplement intake and ADG in the first week post-weaning). In the period between the 4th and 7th day post-weaning, piglets with access to milk replacer maintained their feed intake and gained less weight, while their feed conversion (FCR) was worse than that of the control group ($P>0.05$). During the other periods, and considering the whole experimental period, there were no significant differences in performance between treatments.

In Experiment 2, with piglets weaned at 21 days, there were no significant differences in performance between animals that received F and those that received F+MR for 4 days post-weaning (Table 3). Milk replacer intake averaged 15.10 g per day per animal, representing 7.37% of daily food intake. During the other periods and

considering the whole period, there were no significant differences in performance between treatments.

Daily feed intake

Daily feed intake in Experiment 1 was evaluated for 14 days after weaning, and showed a linear increase ($P < 0.05$; Fig. 1(a)). An increased feed intake ratio of 71.31 g and 70.09 g per post-weaning day was observed, with a coefficient of determination (R^2) of 0.81 and 0.77 for the F and F+MR treatments, respectively. Considering the differences in daily feed intake between treatments (Fig. 1(b)), there was greater feed intake on the second and third post-weaning days for piglets receiving the milk replacer.

In Experiment 2 (Fig. 2 (a)) there was a linear increase in feed intake of 55.86 g and 50.41 g at 7 days post-weaning, and a coefficient of determination (R^2) of 0.81 and 0.79, for the F and F+MR treatments respectively. Milk replacer intake (Fig. 2 (b)) over the 4 days of supply was constant.

Diarrhea score

Milk replacer supply did not affect feces consistency during Experiments 1 and 2 (Table 4). In Experiment 1 diarrhea was recorded during the first 7 days after weaning, whereas in Experiment 2 there were no records of diarrhea during the first 3 days after weaning, but there were sporadic records until 21 days post-weaning.

Intestinal morphology

The villus length in the duodenum was greater in animals supplemented with milk replacer ($P < 0.01$), while the villus length in the jejunum and ileum was greater in

piglets from the control treatment ($P < 0.05$; Fig. 3). As for the area and perimeter of Peyer's patches, piglets in the F group had small and numerous plaques, and piglets in the F+MR group had large and infrequent patches.

Behavioral measurements

There were no differences in behavior between treatments during the experimental period (Fig. 4). The post-weaning piglets spent most of their time resting, feeding and exploring the environment. Over time there were differences in the behaviors of resting, such that on day 9 there was a reduction in the percentage of time spent resting compared to day 6 ($P < 0.05$), and in exploring, such that on day 6 there was a decrease in resting compared to day 1 ($P < 0.05$) and on day 9 there was an increase when compared to the other days ($P < 0.05$).

Discussion

Performance measures

Increasing lactose levels in piglet diets can improve the palatability of the diet, because it is an easily digested/fermented component in the gut of weanling piglets, resulting in higher apparent nutrient digestibility (O'Doherty *et al.*, 2010). The fermentation of lactose in the intestine produces lactic acid, which reduces the pH of the stomach, facilitating digestion by increasing the action of pepsin (Beasley *et al.*, 2015).

Lactose is fermented by the gastrointestinal microbiota preferentially compared to other dietary fibers, and may generate a prebiotic effect (Bach, 2012). This prebiotic effect is achieved when dietary lactose is not digested and is used as a substrate for the fermentation of bacteria, leading to the development of bacteria and

metabolites that improve pig health. With reduced endogenous lactase action in weanling piglets, digestion of this nutrient decreases, and it thus serves as a substrate for the fermentation and production of lactic acid and volatile fatty acids, which are beneficial for gut health and metabolism (Zeng *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018).

There are many lactose sources used in diets for newly weaned piglets, such as pure lactose, different whey powder presentations, skim milk powder, and other dairy products, which can impact performance in different ways. Piglets weaned at 14 days and weighing 4.4 kg that received a diet with 20% dry whey powder showed better performance compared to other lactose sources, due to better protein quality and palatability (Nessmith *et al.*, 1997).

In the present study, the lack of better performance of piglets that received the milk replacer compared to those that received only feed may be due to the quality of the feed provided, which is rich in dairy products, and the composition of the supplement, which was not exclusively a dairy product. The consumption of the supplement may have led to the ingestion of a greater amount of lactose, which may have affected the intestinal microbiota of the piglets. High levels of lactose in piglet diets (29.5%) can lead to negative responses caused by excessive fermentation of lactose by the gut microbiota, leading to a gut osmotic imbalance (Pierce *et al.*, 2005).

The intestinal microbiota of piglets weaned at 23 days and fed exclusively on a commercial pig milk powder substitute, analyzed in fecal samples, mainly comprises two phyla, that is, 61.4% Firmicutes and 32.4% Bacteroidetes at weaning, and 46% Firmicutes and 47.3% Bacteroidetes 4 days after weaning (Poulsen *et al.*, 2017). In the small intestine 1 week after weaning, the microbiota of piglets fed milk replacer is

mainly composed of the phyla Firmicutes (51.5%), Proteobacteria (46%) and Bacteroidetes (1.1%), and the genera *Lactobacillus* (25.5%) and Enterobacteriaceae (34.8%; Poulsen *et al.*, 2017). In piglets of the same age receiving breast milk, the microbiota is mainly composed of Firmicutes (92.9%), Proteobacteria (3.2%) and Bacteroidetes (2.1%), including the genera *Lactobacillus* (64%) and Enterobacteriaceae (0.4%; Poulsen *et al.*, 2017). The genera *Lactobacillus* is part of the phylum Firmicutes, and is associated with the fermentation of dairy components in the diet. The higher abundance of the genera Enterobacteriaceae in animals receiving dairy replacer encompasses enterogenic species of *Escherichia coli*, which is an intestinal pathogen that causes most post-weaning diarrhea in piglets. Another study showed an association between feeding cow's milk-based milk replacer and an increase in Enterobacteriaceae in the neonatal period (Yeruva *et al.*, 2016).

Intestinal morphology

The stress of the weaning period leads to morphological and physiological adaptations in the gastrointestinal tract, such as villus atrophy and crypt hyperplasia (Hampson, 1986; Campbell *et al.*, 2013). Following the change in diet, the activities of brush border enzymes such as lactase and maltase are dramatically reduced between 3 and 5 days after weaning (Hedemann and Jensen, 2004), resulting in a temporary decrease in the digestive and absorptive capacity of the small intestine (Pluske *et al.*, 1997) that often leads to post-weaning diarrhea. In animals that received the milk replacer, the height of the villi in the duodenum was greater, whereas the height of the villi in the jejunum and ileum was greater in the piglets that received the control diet only. In an analysis of the effect of lactose on intestinal morphology Pierce *et al.* (2006) found no difference in villus height and

crypt depth in piglets weaned at 21 days of age and mean weight of 7.8 kg when fed diets with 15% or 33% lactose.

Peyer patches are un-encapsulated lymph node-like structures formed by aggregates of lymphoid follicles with germinal centers of T and B lymphocytes, i.e., they are directly associated with the GALT (lymphatic tissue associated with the intestine) and development of the immune system. In Peyer patches, there is induction of adaptive immune responses against immunogenic antigens in the small intestine. Animals in the control treatment had small and numerous Peyer patches, whereas the piglets that received milk replacer had large and less numerous patches. The changes in the animals supplied with milk replacer may indicate an increase in immune reactivity. The hyperplasia of Peyer's patches is due to the activation of lymphoid follicles in response to the development of pathogenic bacteria, as occurs with enterogenic *Escherichia coli* infection (Stuyven *et al.*, 2010) by increase the genus Enterobacteriaceae in animals receiving milk replacer (Poulsen *et al.*, 2017). The use of milk replacer as feed supplement indicates a non-pathogenic effect on the intestinal microbiota presented by Peyer patches adaptive immune response without affecting piglets' performance, which may cause by the increase in the genus *Lactobacillus* by lactose fermentation (Poulsen *et al.*, 2017).

Behavioral measures

In the study of piglet behavior, the average amount of time spent on the feeder was similar among treatments throughout the evaluation period. Numerically, the means were lower on days 1 and 6, which can be attributed to the fact that on day 1 the animals were adapting to the environment and new diets after weaning, and on

day 6 it can be attributed to the removal of the additional feeder at the end of day 4, when the milk replacer supply stopped.

The amount of time spent resting during the first days after weaning (day 1, 4 and 6) was higher than on subsequent days. In this phase, this behavior may be an indication of chronic stress (Colson *et al.*, 2006). Exploratory behavior was observed more frequently on day 1, reflecting adaptation to the new environment. The average number of fights was slightly higher on the first days after weaning, due to the piglets' adaptation to the new installation and the development of the new social hierarchy (Colson *et al.*, 2006). Belly-nosing was observed on days 1 and 4, being numerically higher in the F group. Weaning induces this type of behavior in piglets (Fraser, 1978), and during the first days after weaning this behavior is indicative of social and feeding stress (Li and Gonyou, 2002; Gardner *et al.*, 2001).

Conclusion

The supplementation with a milk replacer in post-weaning piglets did not affect performance or feed intake in the initial 2 weeks of the nursery phase, when linear growth was observed. The diarrhea index and piglet behavior were also not affected by the supply of milk replacer post-weaning. Piglets fed milk replacer had a greater duodenum villus length and large and sparse Peyer's patches relative to the control, indicating an increase in immune activity.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of Funding

This study was supported of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Data Availability Statement

The data that support this study will be shared upon reasonable request to the corresponding author.

References

- Amdi C, Pedersen M, Klaaborg J, Myhill L, Engelsmann M, Williams A, Thyman T (2021) Pre-weaning adaptation responses in piglets fed milk replacer with gradually increasing amounts of wheat. *British Journal of Nutrition* **126**(3), 375-382.
- Bach Knudsen KE (2012) Lactose in diet influences the degradation of mixed linked β (1-3; 1-4)-D-glucan in the small intestine of pigs. *Journal of Animal Science* **90**, 125–127.
- Beasley DE, Koltz AM, Lambert JE, Fierer N, Dunn RR (2015) The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. *PLoS One* **10**, e0134116.
- Bruininx EMAM, Binnendijk GP, Van der Peet-Schwering CMC, Schrama JW, Den Hartog LA, Everts H, Beynen AC (2002) Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs. *Journal of animal science* **80**(6), 1413-1418.
- Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J (2013) The biological stress of early weaned piglets. *Journal of animal science and biotechnology* **4**(1), 1-4.

- Colson V, Orgeur P, Foury A, Mormède P (2006) Consequences of weaning piglets at 21 and 28 days on growth, behaviour and hormonal responses. *Applied Animal Behaviour Science* **98**, 70-88.
- Fraser D (1978) Observations on the behavioural development of suckling and early-weaned piglets during the first six weeks after birth. *Animal Behaviour* **26**, 22-30.
- Gardner JM, Duncan IJH, Widowski TM (2001) Effects of social “stressors” on belly-nosing behaviour in early-weaned piglets: is belly-nosing an indicator of stress?. *Applied Animal Behaviour Science* **74**(2), 135-152.
- Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S (2017) Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in microbiology* **25**(10), 851-873.
- Hampson DJ (1986) Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science* **40**(1), 32-40.
- Hedemann M, Jensen B (2004) Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Archives of Animal Nutrition* **58**(1), 47-59.
- Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR (2007) Weaning a challenge to gut physiologists. *Livestock Production Science* **108**, 82–93.
- Li Y, Gonyou HW (2002) Analysis of belly nosing and associated behaviour among pigs weaned at 12–14 days of age. *Applied Animal Behaviour Science* **77**, 285–294.
- Liu H, Wang J, He T, Becker S, Zhang G, Li D, Ma X (2018) Butyrate: a double-edged sword for health? *Advances in Nutrition*, **9**(1), 21-29.
- Nessmith WB (1997). Defining quality of lactose sources used in swine diets. *Journal of Swine Health and Production*, **5**(4), 145-149.

- NRC - National Research Council (2012). Nutrient requirements of swine.
- O'Doherty JV, Dillon S, Figat S, Callan JJ, Sweeney T (2010) The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from *Laminaria* spp. on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs. *Animal feed science and technology* **157**(3-4), 173-180.
- Pan L, Zhao PF, Ma XK, Shang QH, Xu YT, Long SF, Wu Y, Yuan FM, Piao XS (2017) Probiotic supplementation protects weaned pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge and improves performance similar to antibiotics. *Journal of Animal Science* **95**(6), 2627-2639.
- Pierce KM, Callan JJ, Macarthy P, O'doherty JV (2005) Performance of weanling pigs offered low and high lactose diets supplemented with avilamycin or inulin. *Animal Science* **80**, 313–318.
- Pierce KM, Sweeney T, Brophy PO, Callan JJ, Fitzpatrick E, McCarthy P, O'Doherty JV (2006) The effects of lactose and inulin on intestinal morphology, selected microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the gastrointestinal tract of the weanling pig. *Animal Science* **82**, 311–318.
- Pluske JR (2001) Morphological and functional changes in the small intestine of the newly weaned pig. In: 'Gut environment of pigs' (Eds. Piva A, Knudsen KEB, Lindberg JE), pp. 1-27. (Nottingham: University Press).
- Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH (1997) Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* **51**, 215-236.
- Pluske JR, Thompson MJ, Atwood CS, Bird PH, Williams IH, Hartmann PE (1996) Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide

digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *British Journal of Nutrition* **76**(3), 409-422.

Poulsen ASR, de Jonge N, Sugiharto S, Nielsen JL, Lauridsen C, Canibe N (2017)

The microbial community of the gut differs between piglets fed sow milk, milk replacer or bovine colostrum. *British Journal of Nutrition* **117**(7), 964-978.

Stuyven E, Van Den Broeck W, Nauwynck H, Goddeeris BM, Cox E (2010) Oral

administration of beta-1, 3/1, 6-glucan Macrogard® fails to enhance the mucosal immune response following oral F4 fimbrial immunisation in gnotobiotic pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* **137**, 291-297.

Yeruva L, Spencer NE, Saraf MK, Hennings L, Bowlin AK, Cleves MA, Mercer K,

Chintapalli SR, Shankar K, Rank RG, Badger TM, Ronis MJJ (2016) Formula diet alters small intestine morphology, microbial abundance and reduces VE-cadherin and IL-10 expression in neonatal porcine model. *BMC Gastroenterology* **16**(1), 1-13.

Zeng X, Sunkara LT, Jiang W, Bible M, Carter S, Ma X, Qiao S, Zhang G (2013)

Induction of porcine host defense peptide gene expression by short-chain fatty acids and their analogs. *PLoS One* **8**:e72922.

Table 1 - Calculated nutritional composition of the feed and milk replacer offered to the weaned piglets (values are expressed on a natural matter basis).

Composition	Pre- Starter I	Pre- Starter I II	Starter	Milk Replacer
Metabolic energy (kcal/kg)	3560	3400	3350	3250
Lactose (%)	10,50	5,60	0	20,00
Total calcium (%)	0,84	0,84	0,75	0,70
Total phosphorus (%)	0,67	0,66	0,61	0,35
Standardized phosphorus (%)	0,45	0,43	0,38	0,26
Sodium (%)	0,36	0,34	0,25	0,35
Crude protein (%)	19,64	19,4	18,19	18,50
Digestible lysine (%)	1,45	1,37	1,26	1,37
Arginine (%)	1,33	1,29	1,13	1,28
Histidine (%)	0,53	0,5	0,41	0,50
Isoleucine (%)	0,85	0,8	0,68	0,78
Leucine (%)	1,65	1,54	1,31	1,54
Methionine (%)	0,44	0,46	0,45	0,50
Methionine+Cystine (%)	0,78	0,76	0,7	1,08
Phenylalanine (%)	0,96	0,91	0,78	0,90
Phenylalanine+Tyrosine (%)	1,67	1,6	1,37	1,70
Threonine (%)	0,86	0,82	0,75	0,81
Tryptophan (%)	0,27	0,24	0,2	0,23
Valine (%)	0,99	0,92	0,76	0,94

Table 2 - Performance of piglets weaned at 28 days of age fed or not with a milk replacer on the first 3 days after weaning (Experiment 1).

Variable	F	F+MR	SEM	P-value
Weight (kg)				
BWi (kg)	9.34	9.42	0.272	0.900
BWf (kg)	25.43	25.00	0.534	0.702
1 to 3 days				
DFI (g)	201.61	313,59	20,810	0,002*
DFI_F (g)	201.61	231,33	19,473	0.372
DFI_MR (g)	0.00	82,25	11,641	0.001**
ADG (g)	139	92	21,138	0,260
4 to 7 days				
DFI (g)	541.58	489.12	20.994	0.220
ADG (g)	411	341	23.284	0.148
1 to 7 days				
DFI (g)	395.88	373,85	15,834	0.697
ADG (g)	295	235	17.733	0.090
FCR	1.38	1,59	0,082	0,001*
8 to 21 days				
DFI (g)	1035.38	1050.93	32.256	0.817
ADG (g)	711	714	12.811	0.910
FCR	1.67	1.68	0.040	0.884
22 to 28 days				
DFI (g)	1159.39	1205.50	28.945	0.441
ADG (g)	754	743	16.579	0.749
FCR	1.54	1.62	0.029	0.198
1 to 28 days				
DFI (g)	906.51	918,31	20.210	0,564
ADG (g)	575	557	11,498	0.455
FCR	1.58	1,64	0.024	0.131

F: control treatment, piglets fed with pre-starter I feed on the first four post-weaning days; F+MR: treatment were piglets fed with pre-starter I feed and milk replacer on the first four post-weaning days; SEM: standard error of the mean; BWi: initial body weight; BWf: final body weight; DFI: daily feed intake; DFI_F: daily feed intake of feed on the first three days after weaning; DFI_MR: daily milk replacer intake of feed on the first three days after weaning; ADG: average daily weight gain; FCR: feed conversion ratio. *Difference between treatments detected by Student's t-test at 5% significance level; **Difference between treatments detected by Student's t-test at 1% significance level.

Table 3 - Performance of piglets weaned at 21 days of age fed or not with a milk replacer on the first 4 days after weaning (Experiment 2).

Variable	F	F+MR	SEM	P-value
Weight (kg)				
BWi (kg)	6.94	6.82	0.158	0.714
BWf (kg)	23.35	23.61	0.339	0.710
1 to 4 days				
DFI (g)	199.66	205.37	8.684	0.752
DFI_F (g)	199.70	190.30	8.747	0.605
DFI_MR (g)	0	15.10	2.397	0.000*
ADG (g)	143.17	158.00	14.818	0.630
5 to 7 days				
DFI (g)	361.55	349.19	10.780	0.580
ADG (g)	306.66	277.77	11.874	0.233
1 to 7 days				
DFI (g)	280.61	277.28	7.833	0.838
ADG (g)	213.23	209.33	11.325	0.868
FCR	1.32	1.31	0.033	0.935
8 to 21 days				
DFI (g)	805.92	828.01	18.989	0.575
ADG (g)	549.14	566.24	13.945	0.554
FCR	1.47	1.46	0.014	0.847
22 to 35 days				
DFI (g)	938.40	973.72	17.098	0.314
ADG (g)	519.09	531.14	13.938	0.677
FCR	1.82	1.84	0.031	0.660
1 to 35 days				
DFI (g)	674.97	693.00	11.041	0.429
ADG (g)	469.94	480.81	7.790	0.500
FCR	1.43	1.44	0.011	0.849

F: control treatment, piglets fed with pre-starter I feed on the first three post-weaning days; F+MR: treatment were piglets fed with pre-starter I feed and milk replacer on the first three post-weaning days; SEM: standard error of the mean; BWi: initial body weight; BWf: final body weight; DFI: daily feed intake; DFI_F: daily feed intake of feed on the first four days after weaning; DFI_MR: daily milk replacer intake of feed on the first four days after weaning; ADG: average daily weight gain; FCR: feed conversion ratio. *Difference between treatments detected by Student's t-test at 1% significance level.

Table 4: Effect of milk replacer on the first 3 post-weaning days on the diarrhea index (Experiment 1) and of milk replacer on the first 4 post-weaning days (Experiment 2).

Experiment 1				Experiment 2			
Period	F (%)	F+MR (%)	P-value	Period	F (%)	F+MR (%)	P-value
1 to 3 days	36.67	40.00	0.628	1 to 4 days	0	0	1
4 to 7 days	7.50	3.33	0.193	5 to 7 days	4.44	1.11	0.152
1 to 7 days	40.00	30.47	0.158	1 to 7 days	1.90	0.47	0.350
8 to 14 days	0	0	1	8 to 14 days	1.90	4.28	0.331
15 to 21 days	0	0	1	15 to 21 days	0.47	0.47	1

No differences in treatments by Qui-Squared test at 5% significance level ($P>0,05$).

Figure captions:

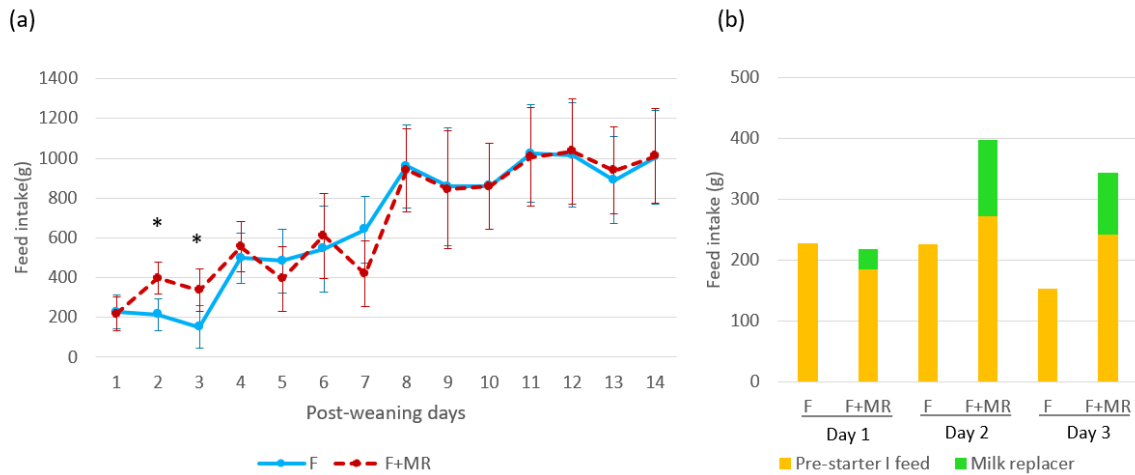
Figure 1: Daily feed intake during the 14 post-weaning days of piglets weaned at 28 days of age (a) and daily feed and milk replacer intake per treatment during the first 3 days after weaning (b) in Experiment 1.

Figure 2: Daily feed intake during the 7 post-weaning days of piglets weaned at 21 days of age (a) and daily feed and milk replacer intake per treatment during the first 4 days after weaning (b) in Experiment 2.

Figure 3: Duodenum, jejunum and ileum villus length and area and perimeter of ileum Peyer patches in piglets weaned at 28 days with and without milk replacer supplementation during the first 3 post-weaning days (Experiment 1).

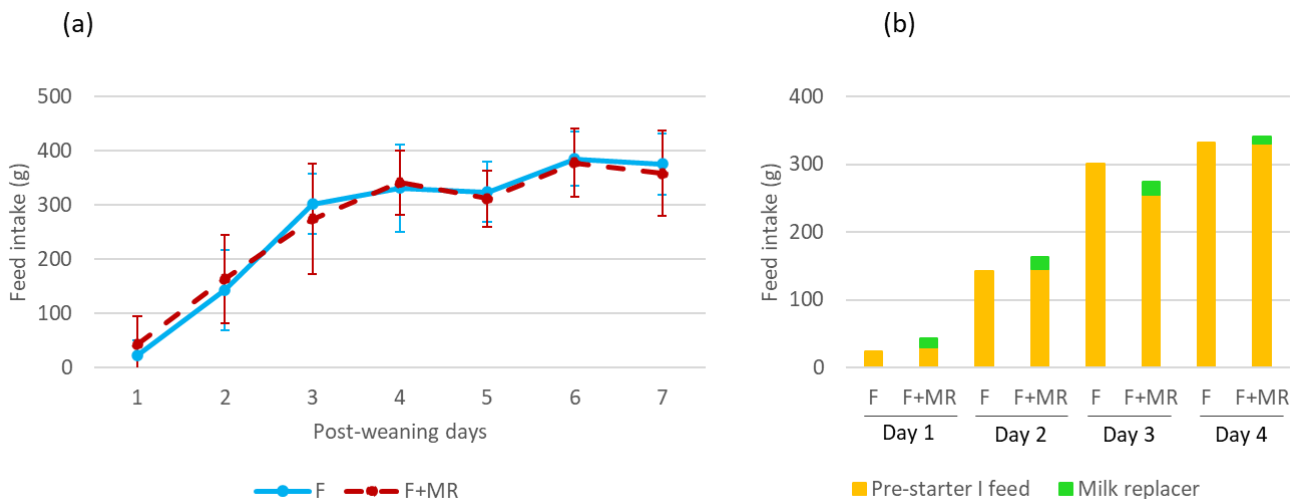
Figure 4: Behavior of piglets weaned at 28 days of age with and without milk replacer supplementation during the first 3 post-weaning days (Experiment 1).

Figure 1: Daily feed intake during the 14 post-weaning days of piglets weaned at 28 days of age (a) and daily feed and milk replacer intake per treatment during the first 3 days after weaning (b) in Experiment 1.



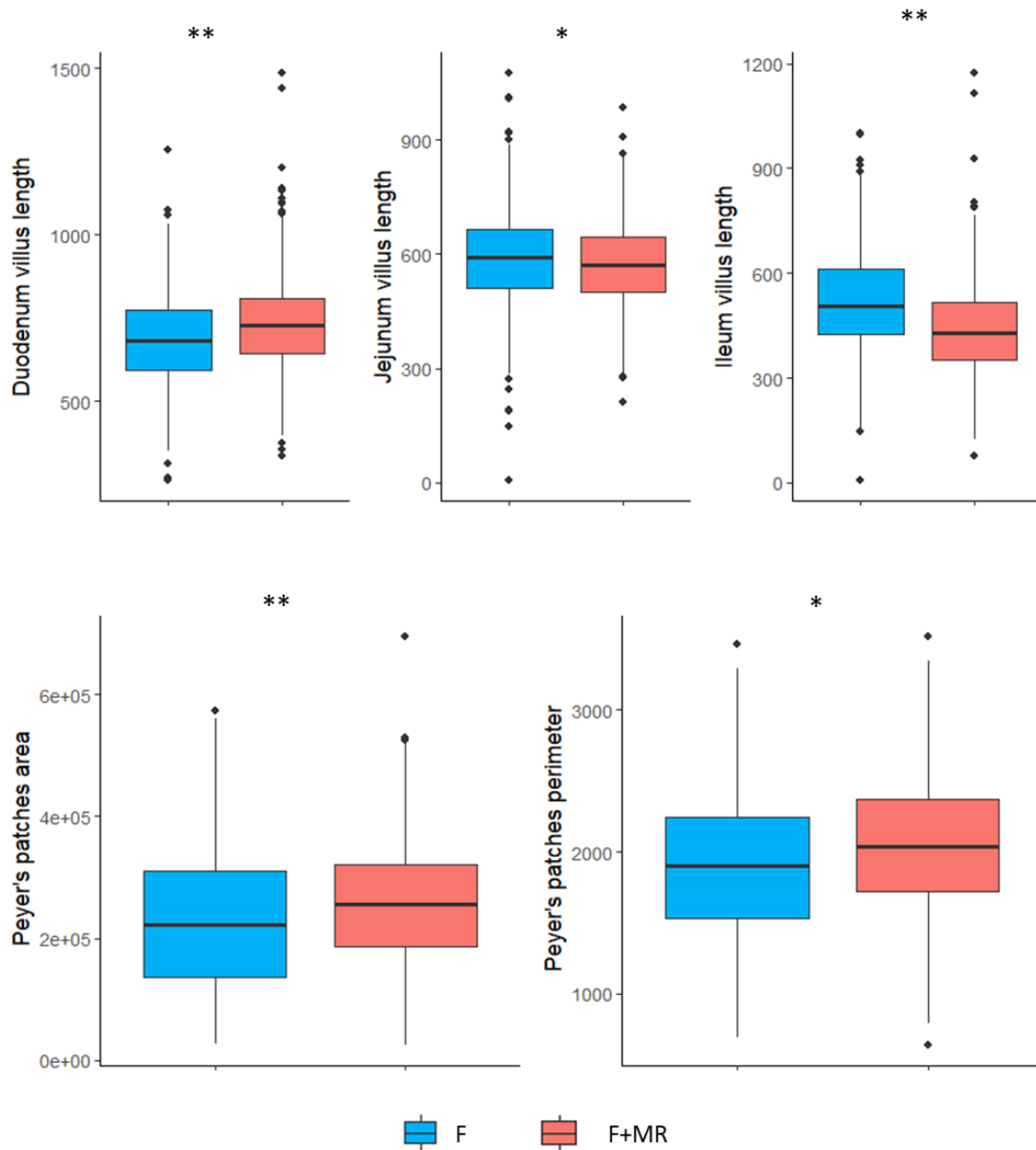
*Difference between treatments by t-Student test at 5% significance level (P<0,05).

Figure 2: Daily feed intake during the 7 post-weaning days of piglets weaned at 21 days of age (a) and daily feed and milk replacer intake per treatment during the first 4 days after weaning (b) in Experiment 2.



*No differences between treatments by t-Student test at 5% significance level (P>0,05).

Figure 3: Duodenum, jejunum and ileum villus length and area and perimeter of ileum Peyer patches in piglets weaned at 28 days with and without milk replacer supplementation during the first 3 post-weaning days (Experiment 1).

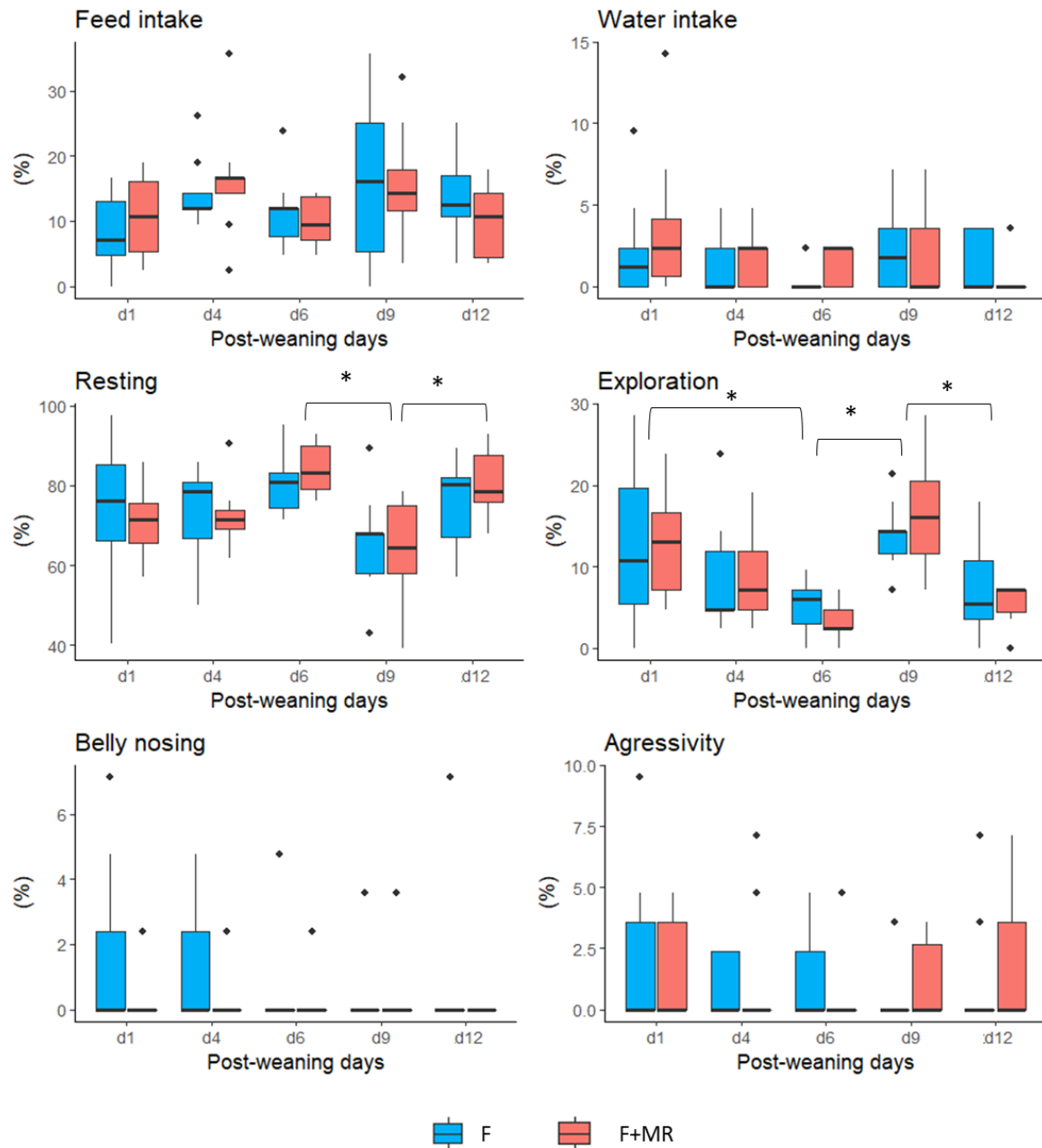


F: control treatment, piglets fed with pre-starter I feed on the first four post-weaning days; F+MR: treatment were piglets fed with pre-starter I feed and milk replacer on the first four post-weaning days.

*Significant difference by Mann-Whitney U test at 5% significance level between treatments ($P < 0.05$);

**Significant difference by Mann-Whitney U test at 1% significance level between treatments ($P < 0.01$).

Figure 4: Behavior of piglets weaned at 28 days of age with and without milk replacer supplementation during the first 3 post-weaning days (Experiment 1).



No significant difference between treatments by Mann-Whitney test between treatments. *Difference between observation days by Kruskal-Wallis test at 5% significance. d1, d4, d6, d9, d12 = days 1, 4, 6, 9, and 12 after behavior observations were made, respectively.

**5- ARTIGO III - EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DA DIETA SOBRE A
MICROBIOTA INTESTINAL DE LEITÕES DESMAMADOS: REVISÃO
SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DA DIETA SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE LEITÕES DESMAMADOS: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

RESUMO

A presente revisão sistemática de literatura e metanálise teve o objetivo de avaliar os efeitos da adição de moduladores da microbiota intestinal, do tipo de dieta, e a relação do consumo de proteína bruta, energia metabolizável e lisina na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados. A pesquisa de literatura foi realizada buscando artigos publicados entre 2015 e 2022, nas bases de busca da Science direct, Web of Science e PubMed utilizando os termos: “Microbiota”, “Microbiome”, “Gut microbiota”, “16SrRNA”, “Weaning piglets”, “Weaned piglets”. Foram encontrados 112 artigos, que passaram por uma triagem seguindo critérios de inclusão, sendo selecionados sete artigos para extração dos dados. A base de dados continha informações sobre a dieta, informações experimentais e os resultados da análise da composição da microbiota intestinal. A metanálise foi conduzida utilizando duas abordagens: 1) avaliação do efeito da adição ou não de substâncias moduladoras da microbiota intestinal na dieta sobre os principais filos da microbiota intestinal; e 2) o efeito de subgrupos definidos pelas características e composição da dieta na média geral dos principais filos da microbiota intestinal. Os filos mais abundantes na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados foram Firmicutes e Bacteroidetes, com médias de 43,18% e 43,07%, respectivamente. Não houve efeito significativo da adição de substâncias moduladoras da microbiota intestinal nas dietas e do consumo de lisina na abundância dos filos. Em dietas com aveia, cevada, trigo e arroz na composição ocorreu um aumento na abundância dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria. Leitões que ingeriram uma maior quantidade de proteína por peso vivo metabólico apresentaram uma abundância maior do filo Firmicutes, enquanto nos com menor consumo o filo Bacteroidetes foi mais abundante. Animais com consumo de energia metabolizável menor que 512 kcal/kg PV^{0,75} apresentaram maior abundância do filo Firmicutes em sua microbiota intestinal. Os resultados demonstram que os principais filos que compõem a microbiota intestinal de leitões desmamados são Firmicutes e Bacteroidetes, dietas com base em milho e soja e com menor consumo de proteína apresentam menor abundância do filo Firmicutes na microbiota intestinal.

Palavras-chave: Bacteroidetes, Consumo proteína, Consumo energia, Firmicutes.

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal dos mamíferos abriga um complexo ecossistema, incluindo bactérias, vírus, fungos, protozoários e arquea, formando a microbiota intestinal. A microbiota intestinal desempenha papéis fundamentais no metabolismo, imunidade, fisiologia e desempenho do seu hospedeiro (LIM et al., 2016, LARSEN e CLAASSEN, 2018).

A microbiota intestinal dos leitões inicia sua formação ao nascimento e passa por variações na sua composição ao longo da vida e do trato gastrointestinal, em função da dieta, ambiente e situações de estresse. Um dos períodos de maior estresse na vida dos suínos é o desmame, seja em função do afastamento da mãe, da adaptação a um novo ambiente ou com leitões que não são da mesma leitegada, e principalmente, por uma grande mudança na alimentação (FOWLER e GILL, 1989). Somando o estresse intenso e o sistema imune ainda em desenvolvimento, o equilíbrio das populações bacterianas intestinais é afetado, favorecendo o crescimento de bactérias patogênicas, aumentando a suscetibilidade dos leitões à diarreia pós-desmame (GRESSE et al., 2017).

Durante o desmame, a dieta dos leitões muda abruptamente de um leite com alto teor de gordura e poucos carboidratos, para um alimento sólido com alto teor de carboidratos e baixo teor de gordura, com ingredientes à base de plantas. Essas mudanças resultam em alterações nas abundâncias dos filos e gêneros que compõem a microbiota intestinal dos leitões. Por exemplo, na microbiota de amostras coletadas no reto de leitões lactantes predominam os filos Bacteroidetes (44,14%), Firmicutes (41,01%) Espiroquetas (9,87%) e Proteobacteria (2,94%; GUEVARRA et al., 2018). Enquanto que em leitões uma semana pós-desmame os filos Bacteroidetes (63,14%), Firmicutes (34,27%) e Proteobacteria (1,79%) são mais abundantes (GUEVARRA et al., 2018). A mudança na abundância dos filos em leitões no período pós-desmame é um indicativo de adaptação à dieta com carboidratos e proteínas de origem vegetal.

Compreender melhor as interações e os mecanismos de ação entre a dieta e a composição da microbiota intestinal de leitões pode fornecer informações importantes para melhorar a saúde e a produtividade, e reduzir o uso de antibióticos na produção. Dessa forma, o objetivo desta revisão sistemática de literatura e metanálise foi avaliar os efeitos da adição de moduladores da microbiota intestinal, do tipo de dieta, e a relação do consumo de proteína bruta, energia metabolizável e lisina na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados.

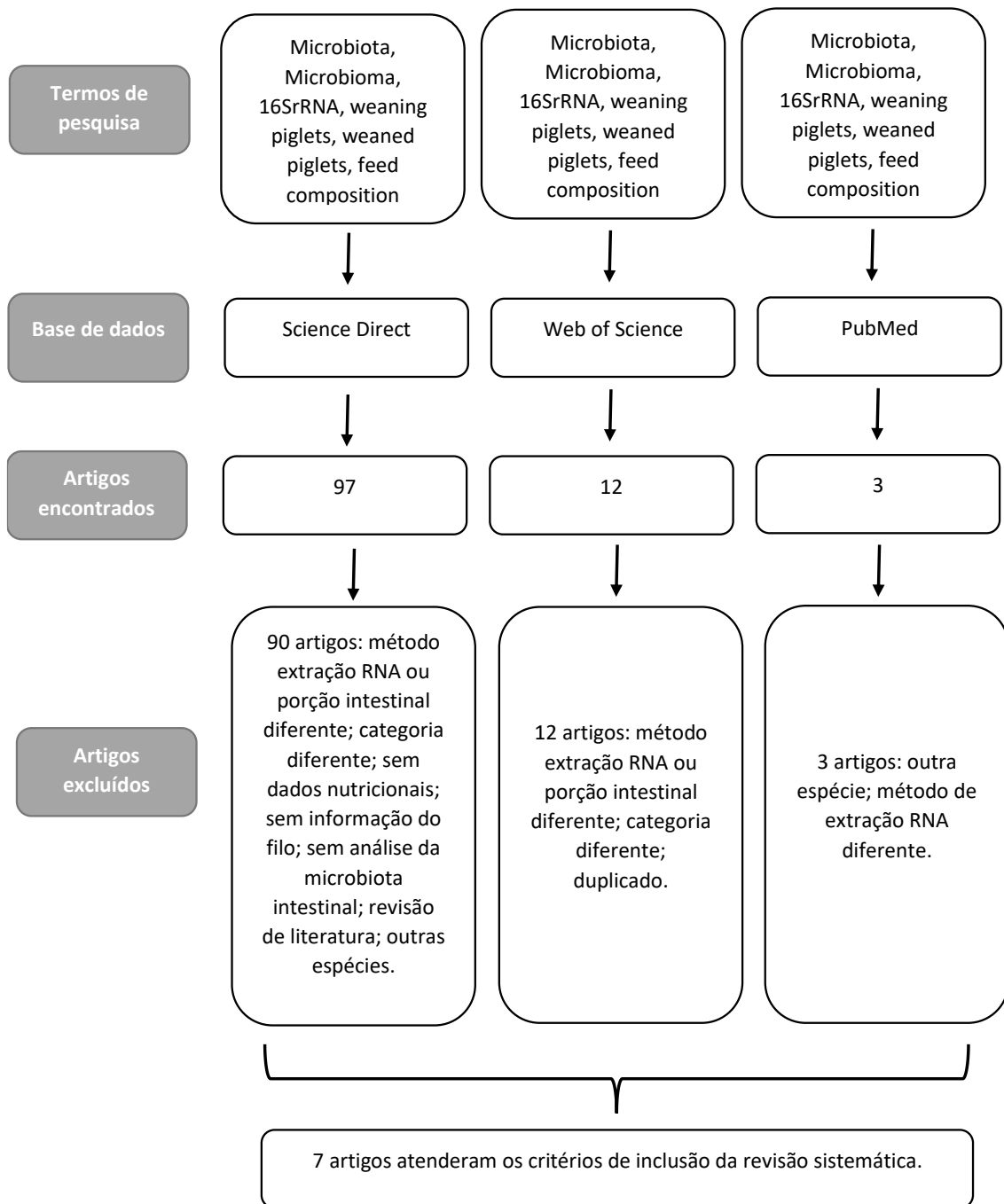
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REVISÃO SISTEMÁTICA E SELEÇÃO DOS ESTUDOS

A pesquisa sistemática de literatura para este estudo foi realizada buscando artigos publicados entre 2015 e 2022, nas bases de busca da Science direct, Web of Science e PubMed através do Portal de Periódicos CAPES (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>). As pesquisas foram feitas através da combinação das palavras-chave: “Microbiota”, “Microbiome”, “Gut microbiota”, “16SrRNA”, “Weaning piglets”, “Weaned piglets”. A seleção dos artigos seguiu os seguintes critérios: 1) artigos científicos revisados por pares publicados no período definido na pesquisa de artigos; b) informações sobre a composição das dietas utilizadas nos estudos; c) análise da microbiota intestinal por meio da técnica de 16SrRNA, na região V3-V4 do RNA ribossômico, de amostras fecais coletadas frescas ou no reto de leitões após o desmame.

Foram encontrados um total de 112 artigos na pesquisa de revisão sistemática. Após a triagem dos estudos seguindo os critérios de inclusão, foram removidos 105 documentos, permanecendo sete artigos para extração dos dados (Figura 1).

Figura 1. Diagrama da pesquisa, triagem e extração dos dados da literatura científica.



2.2 ELABORAÇÃO DA BASE DE DADOS

A base de dados foi elaborada e armazenada em uma planilha eletrônica contendo as informações retiradas da metodologia e dos resultados de cada artigo selecionado. As variáveis coletadas relativas ao artigo foram autores, ano de publicação, título do artigo, local da pesquisa e periódico de publicação. As informações sobre a dieta extraídas foram a composição

nutricional e os principais ingredientes utilizados na elaboração das dietas. Nos casos em que a quantidade de energia da ração utilizada no estudo estava disponível em MJ/kg, a mesma foi convertida para Mcal/kg multiplicando pela taxa de conversão de 0,239.

Também foram extraídas as informações experimentais como os tratamentos utilizados, número de animais utilizados no estudo, linhagem dos animais, peso vivo ao desmame e idade ao desmame. E, quando disponíveis no estudo, também foram extraídos os dados do desempenho dos leitões (consumo médio diário, ganho médio diário e conversão alimentar).

Para a análise da composição da microbiota intestinal foram extraídos o tipo de coleta para análise, o número de coletas e os resultados de abundância dos filos. Os dados da composição da microbiota intestinal apresentados em gráficos nos artigos selecionados foram extraídos utilizando o software WebPlotDigitizer. Os detalhes e características dos estudos incluídos na base de dados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Detalhes dos estudos incluídos na metanálise.

Autores	Nº Animais	Tratamento	Idade Desmame	Peso desmame(kg)	Coleta microbiota
Wei et al., 2022	96	Controle e 50, 100 e 150 mg/kg de Procianidinas de semente de uva.	21	6,48 ± 0,26	Retal
Han et al., 2018	144	Controle, Antibiótico promotor de crescimento, Ácido orgânico e Combinação de ácidos orgânicos.	28	8,08 ± 0,12	Fecal
Huang et al., 2020	48	Controle e dieta com ingrediente fermentado.	21	5,77 ± 0,23	Fecal
Luisse et al., 2020a	32	Controle.	25	5,46 ± 0,31	Fecal
Trckova et al., 2018	45	Controle, 20 g/kg leonardite e 20 g/kg lignite.	28	9,58 ± 0,92	Retal
Li et al., 2020	90	Controle e 50 mg/kg extrato <i>Macleaya cordata</i> .	35	9,89 ± 0,12	Retal
Luisse et al., 2020b	144	Controle.	26	6,45 ± 0,11	Fecal

O peso vivo estimado dos leitões no dia da coleta das amostras para análise da composição da microbiota intestinal, foi calculado a partir do ganho de peso médio diário (GMD (kg)) multiplicado pelo número de dias do desmame até a coleta das amostras, somando com o peso vivo dos leitões ao desmame, para os estudos que continham os dados de GMD no período experimental. A partir do peso vivo estimado foi mensurado o peso vivo metabólico estimado, elevando o valor do peso estimado em 0,75. Após, a proteína bruta da dieta (PB (g)),

lisina (g) e a energia metabolizável (EM (kcal)) foram divididas pelo peso metabólico estimado ($PV^{0,75}$), a fim de calcular a relação de PB (g) e EM (kcal) por peso vivo metabólico, ou seja, consumo de PB g/kg $PV^{0,75}$, consumo de lisina g/kg $PV^{0,75}$ e EM kcal/kg $PV^{0,75}$ dos leitões utilizados nos estudos.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS E METANÁLISE

Foi realizada uma análise descritiva dos dados da composição da microbiota extraídos dos artigos, a fim de descrever e caracterizar os dados extraídos dos estudos selecionados na revisão sistemática. A metanálise foi realizada utilizando duas abordagens: 1) avaliação do efeito da adição ou não de substâncias moduladoras da microbiota intestinal na dieta de leitões desmamados sobre os principais filos da microbiota intestinal; e 2) o efeito de subgrupos definidos pelas características e composição da dieta dos estudos na média geral dos principais filos da microbiota intestinal.

O efeito da adição ou não de substâncias moduladoras da microbiota intestinal na dieta foi abordado pois a maioria dos estudos selecionados utilizou o tratamento controle e tratamentos com a inclusão de aditivos que possuem a função de favorecer o crescimento e atividade de bactérias benéficas à saúde intestinal nas dietas. O estudo que utilizou um tratamento com antibiótico promotor de crescimento na dieta (HAN et al., 2018), e o estudo que comparou a dieta controle com dieta fermentada (HUANG et al., 2020) foram desconsiderados para esta abordagem de metanálise.

Os subgrupos foram definidos para analisar o efeito geral da abundância dos filos da microbiota intestinal de leitões coletados nos estudos. O subgrupo tipo de dieta foi definido em dieta com base em milho e soja (presente em três dos estudos selecionados) e outros (os demais estudos selecionados utilizaram dietas com base em milho e cevada, trigo, cevada e soja, milho arroz e soja, e em milho, trigo e soja). Outro subgrupo foi definido a partir da relação do consumo de proteína bruta (PB (g)) pelo peso vivo metabólico estimado (kg), sendo classificada como maior os estudos com consumo superior a 29 g/kg $PV^{0,75}$, e em menor estudos com consumo inferior a 29 g/kg $PV^{0,75}$. O terceiro subgrupo foi definido a partir da relação do consumo de energia metabolizável (EM (kcal)) pelo peso vivo metabólico estimado (kg), classificadas em maior para estudos com relação superior a 512 kcal/kg $PV^{0,75}$, e em menor os estudos com relação inferior a 512 kcal/kg $PV^{0,75}$. E o quarto subgrupo foi definido a partir da relação do consumo de lisina (g/kg) pelo peso vivo metabólico estimado (kg), classificadas em maior para estudos com relação superior a 1,91 g/kg $PV^{0,75}$, e em menor os estudos com relação inferior a 1,91 g/ $PV^{0,75}$. O primeiro subgrupo contemplou todos os estudos selecionados na

revisão sistemática. E os demais subgrupos utilizaram os dados dos cinco estudos com dados de desempenho zootécnico disponíveis, e a classificação em maior e menor foi definida de acordo com o valor das medianas de cada variável.

A metanálise foi realizada utilizando as funções *metacont* e *metamean* do pacote *meta* do software R Core Team (2022). Na avaliação do efeito da adição ou não de prebióticos na dieta de leitões desmamados na microbiota intestinal, a diferença entre os tratamentos foi mensurada por meio da diferença média padronizada (SMD). Na avaliação do efeito da média geral dos estudos, as médias dos estudos são comparadas sem transformação (MRAW). O modelo considerado na metanálise foi o de efeitos aleatórios, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

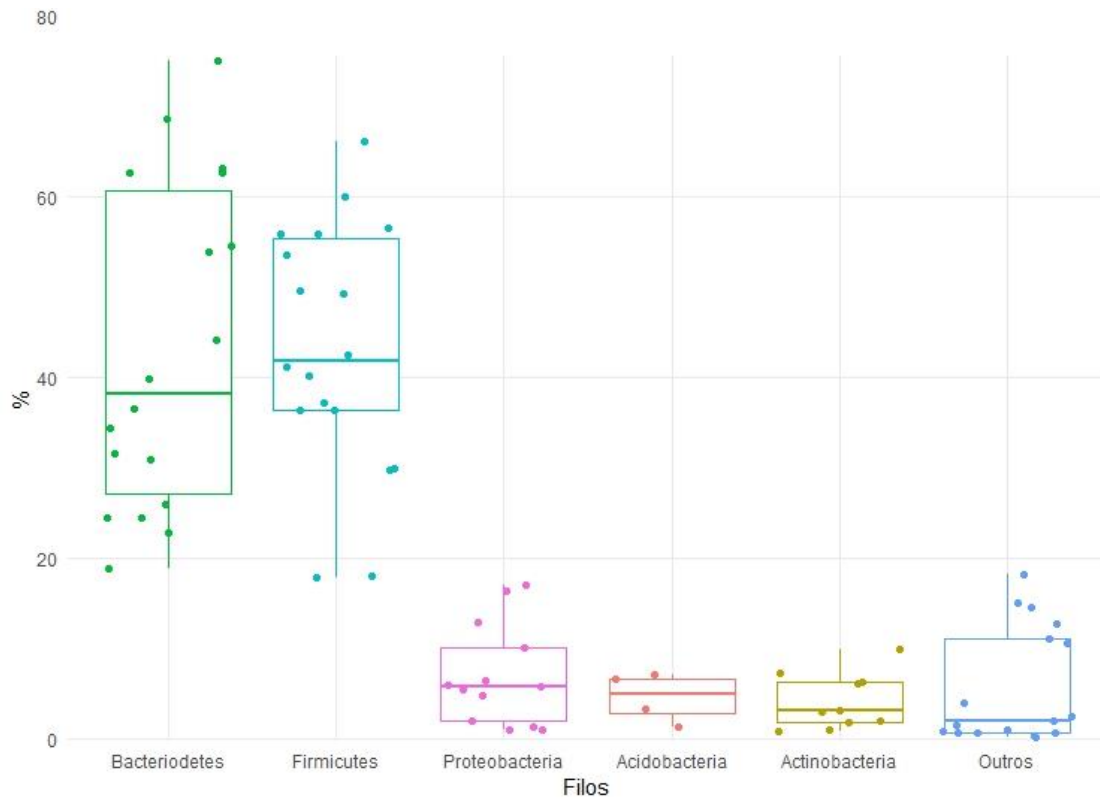
Os estudos selecionados na revisão sistemática utilizaram leitões desmamados em média aos 26 dias de idade, e com peso médio de 7,59 kg (Tabela 2). O peso metabólico estimado dos leitões no dia da coleta das amostras para análise da composição da microbiota intestinal foi em média de 6,14 kg PV^{0,75}. As dietas foram formuladas em média com 3,37 Mcal/kg de EM, 18,84% de PB e 1,33% de lisina.

Tabela 2. Análise descritiva das variáveis utilizadas no estudo.

Variáveis	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Idade de desmame (d)	26	27	21	35	4,48
Peso ao desmame (kg)	7,59	7,28	5,46	9,89	1,58
EM da dieta (Mcal/kg)	3,37	3,40	2,93	3,54	0,16
PB da dieta (%)	18,84	19,00	16,50	19,50	0,83
Lisina da dieta (%)	1,33	1,33	1,19	1,56	0,15
Peso metabólico (kg PV ^{0,75})	6,14	6,47	4,05	7,00	0,86
Relação consumo PB (g/kg PV ^{0,75})	30,88	29,22	25,43	43,24	4,71
Relação consumo EM (g/kg PV ^{0,75})	549,40	512,27	467,02	811,36	98,97
Relação consumo lisina (g/kg PV ^{0,75})	2,10	1,91	1,76	3,43	0,48
Firmicutes (%)	43,18	41,90	17,85	66,13	13,88
Bacteroidetes (%)	43,07	38,26	18,93	75,04	17,96
Actinobacteria (%)	2,33	1,01	0,00	9,90	3,08
Proteobacteria (%)	5,05	3,44	0,00	17,07	5,69

Nos dados da composição da microbiota intestinal de leitões desmamados extraídos dos artigos na revisão sistemática, de forma geral, os filos mais abundantes são Firmicutes e Bacteroidetes, com médias de 43,18% e 43,07%, respectivamente (Figura 2). Em alguns dos estudos selecionados o filo Bacteroidetes é mais abundante na composição da microbiota intestinal que o filo Firmicutes (WEI et al., 2022 (tratamentos com 100 e 150 mg/kg Procionidinas de semente de uva); LUISE et al., 2020a; TRCKOVA et al., 2020; LI et al., 2020 (tratamento controle)).

Figura 2. Boxplot da composição da microbiota intestinal de leitões desmamados dos dados selecionados na revisão sistemática.

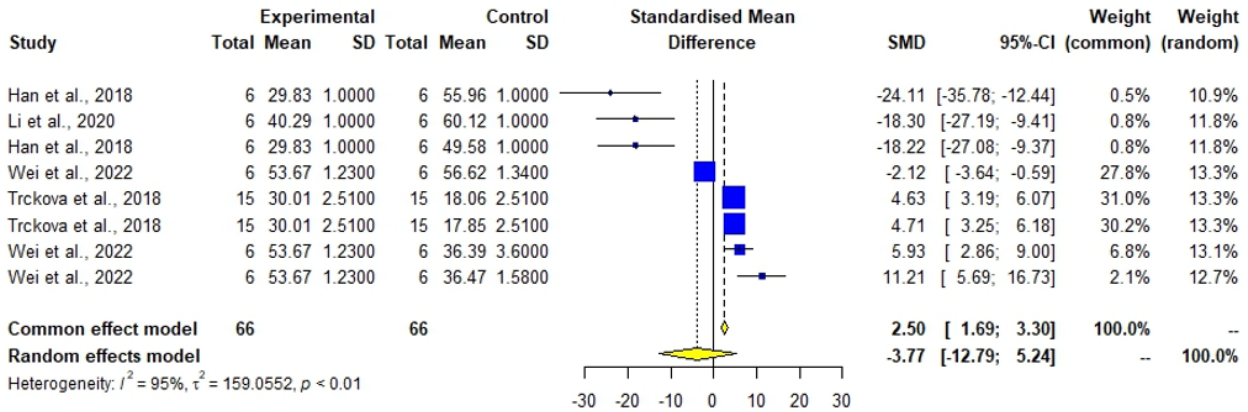


3.2 METANÁLISE DO EFEITO DA ADIÇÃO OU NÃO DE SUBSTÂNCIAS MODULADORAS DA MICROBIOTA INTESTINAL NA DIETA DE LEITÕES DESMAMADOS

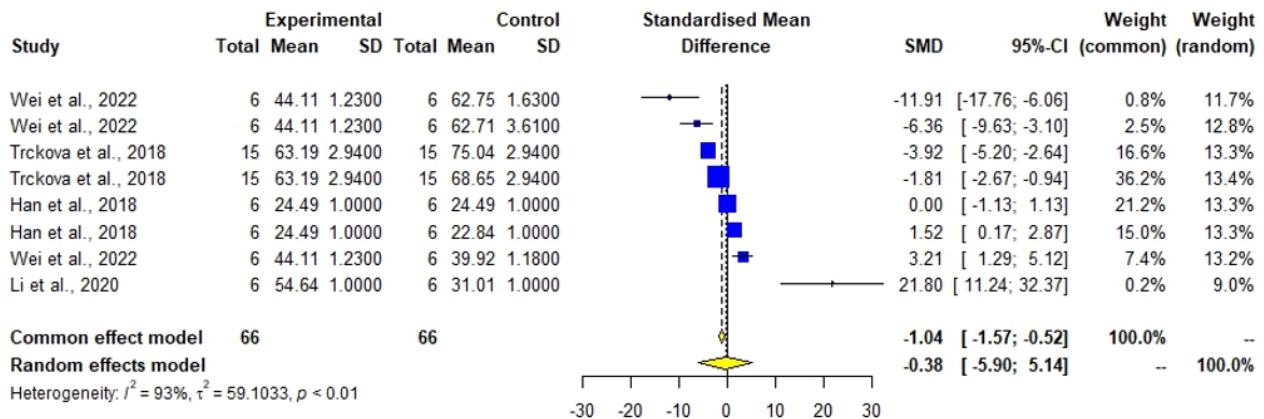
Não houve efeito significativo da adição ou não de substâncias moduladoras da microbiota intestinal em dietas na abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes em leitões na fase de creche (Figura 3). As substâncias utilizadas nas dietas dos estudos selecionados foram procianidinas de semente de uva (WEI et al., 2022), extrato *Macleaya cordata* (LI et al., 2020), ácido orgânico e combinação de ácidos orgânicos (sem especificar quais; HAN et al., 2018), e substâncias húmicas (leonardite e lignite; TRCKOVA et al., 2018).

Figura 3. Forest plot do efeito ou diferença média padronizada (SMD) da adição ou não de substâncias moduladoras da microbiota intestinal em dietas de leitões desmamados na composição dos filos Firmicutes (a) e Bacteroidetes (b).

(a)



(b)



3.3 METANÁLISE DO EFEITO DA MÉDIA GERAL DOS ESTUDOS E SUBGRUPOS

Avaliando o efeito do subgrupo do tipo de ingredientes base da dieta dos leitões no pós-desmame nos principais filos da microbiota intestinal, observou-se uma média maior na abundância do filo Bacteroidetes (Figura 4(a)) no subgrupo outros. E as dietas a base de milho e soja apresentaram uma microbiota com menor quantidade de bactérias do filo Actinobacteria ((Figura 4(b))). Os filos Firmicutes e Proteobacteria não apresentaram diferenças entre os tipos de dieta. Os principais ingredientes proteicos e energéticos das dietas dos estudos selecionados são apresentados na Tabela 3.

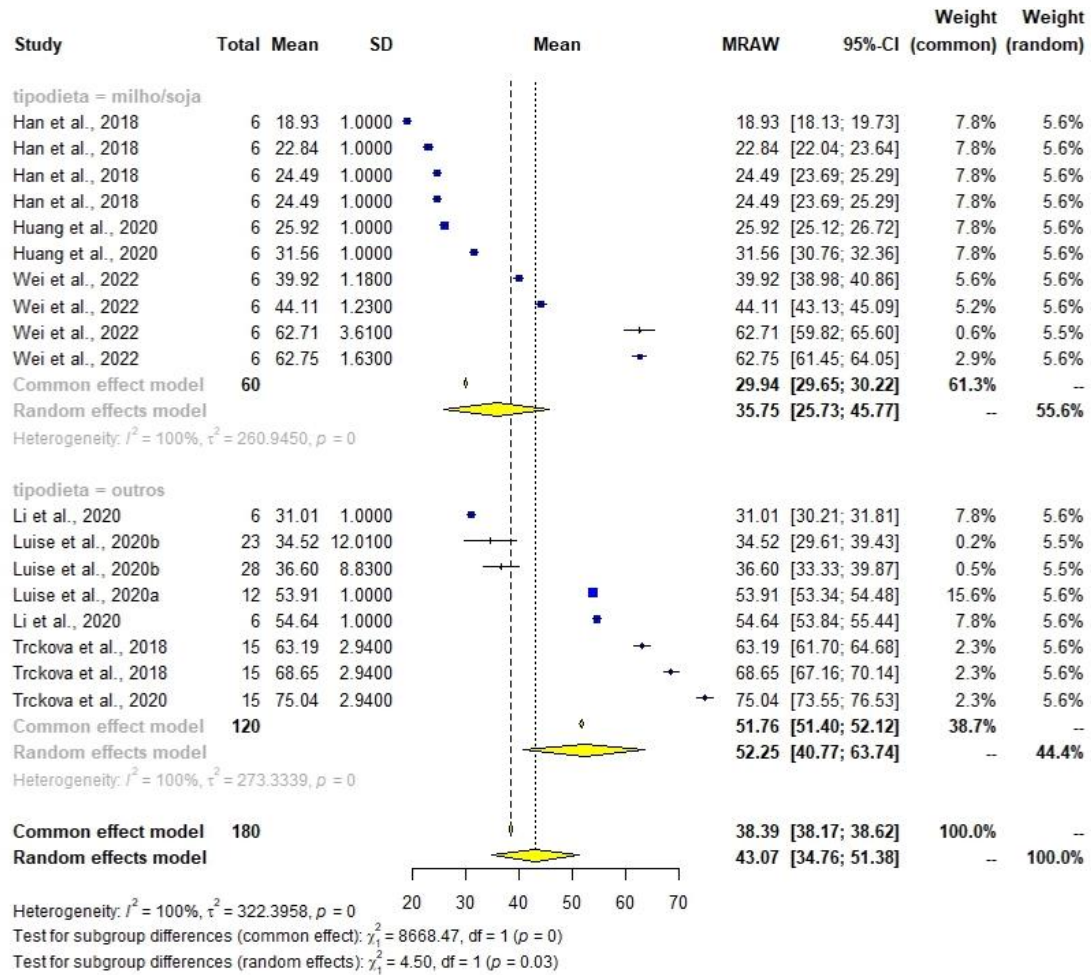
Tabela 3. Principais ingredientes das dietas utilizadas nos estudos selecionados na revisão sistemática.

ID	Base da dieta	Principais ingredientes (%)									
		Milho	Milho expandido	Milho extrusado	Cevada	Trigo	Arroz	Farelo soja	Soja expandida	Soja extrusada	Subprod. biscoito
1	milho/ soja	34,97	22					20	6		
2	milho/ soja		59,3					16		11,1	
3	milho/ soja	38,76		15				22,65		8	
4	milho/cevada	27			25,1						20
5	trigo/cevada/soja				30	40		18,5			
6	milho/arroz/ trigo	25,4				15	23	26,6			
7	milho/ trigo /soja	37,79				26,8		11			

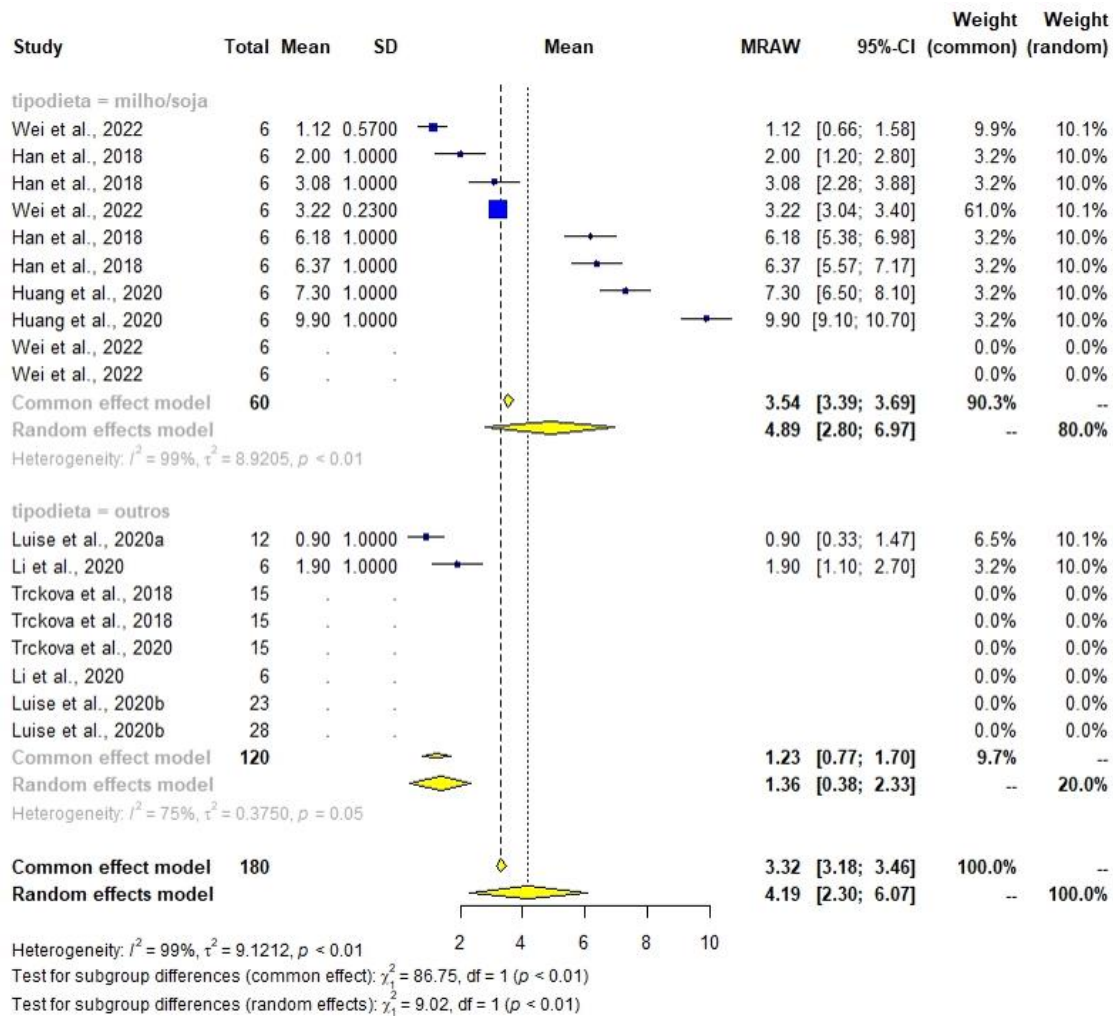
ID = identificação do estudo: 1) Wei et al., 2022; 2) Han et al., 2018; 3) Huang et al., 2020; 4) Luise et al., 2020a; 5) Trckova et al., 2020; 6) Li et al., 2020; 7) Luise et al., 2020b.

Figura 4. Forest plot do efeito do tipo de dieta na média geral de abundância dos filios (a) filo Bacteroidetes e (b) filo Actinobacteria na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados.

(a) filo Bacteroidetes



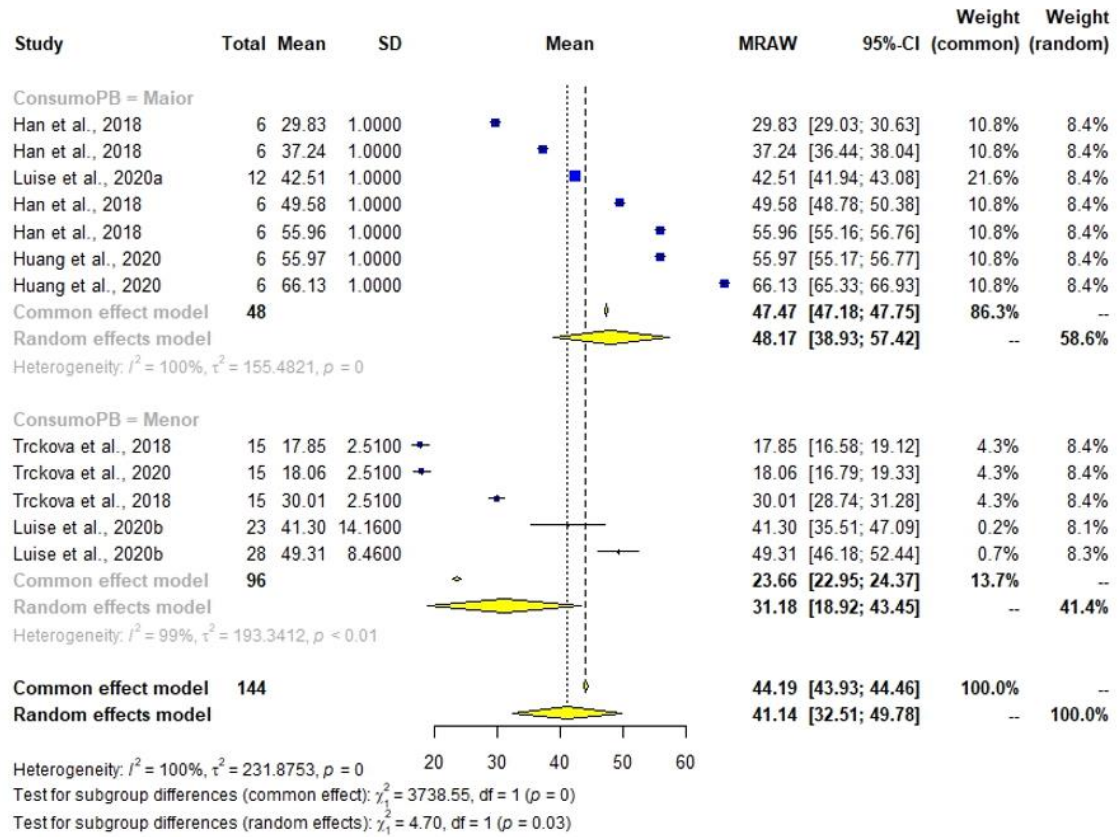
(b) filo Actinobacteria



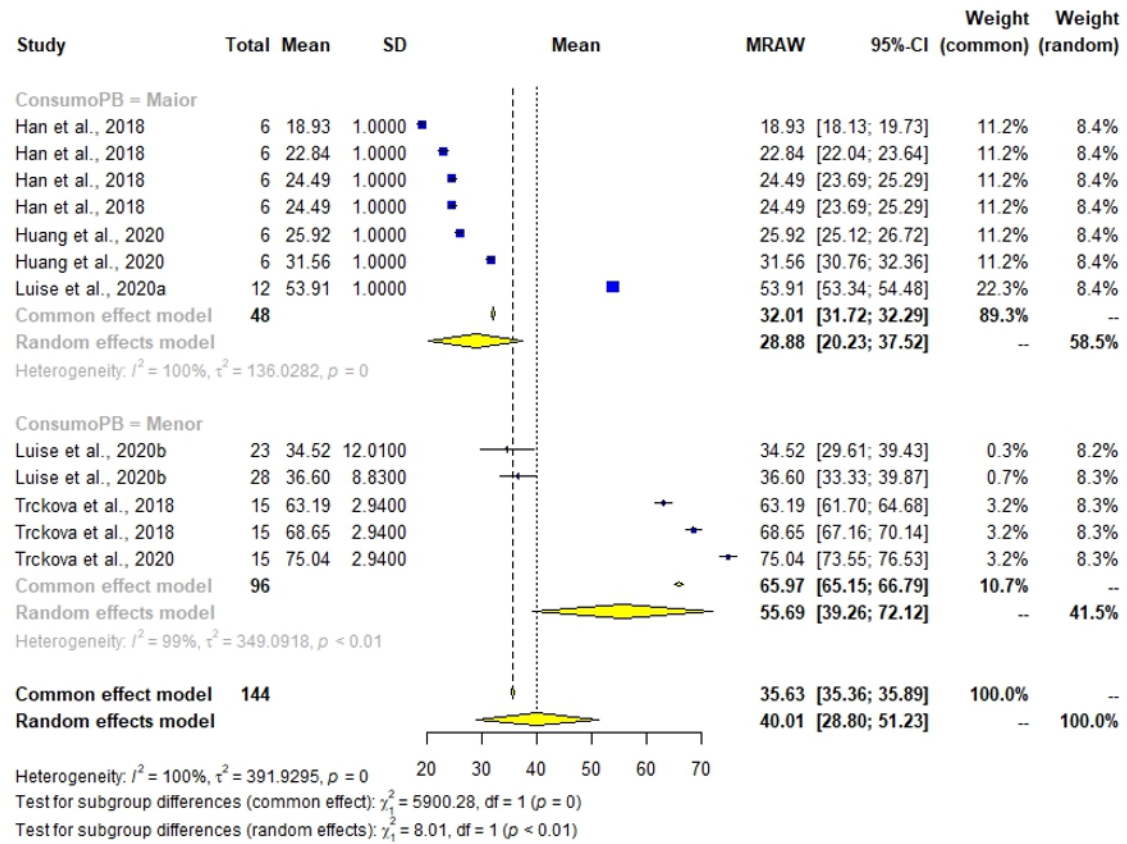
O subgrupo da relação do consumo de proteína bruta pelo peso vivo metabólico estimado ($\text{g/kg PV}^{0.75}$) apresentou efeitos significativos para os filos Firmicutes (Figura 5(a)) e Bacteroidetes (Figura 5(b)). Leitões desmamados que ingeriram uma quantidade de PB por peso vivo metabólico maior que $29 \text{ g/kg PV}^{0.75}$ apresentaram uma abundância média de 48,17% do filo Firmicutes e 28,88% do filo Bacteroidetes na microbiota intestinal. Já os animais com menor relação proteína bruta por peso vivo metabólico estimado ($\text{g/kg PV}^{0.75}$) apresentaram um microbioma com média de 31,18% do filo Firmicutes e 55,69% do filo Bacteroidetes.

Figura 5. Forest plot do efeito relação do consumo de proteína bruta pelo peso vivo metabólico estimado ($\text{g/kg PV}^{0.75}$) na média geral da abundância dos (a) filo Firmicutes e (b) filo Bacteroidetes da microbiota intestinal de leitões desmamados.

(a) filo Firmicutes



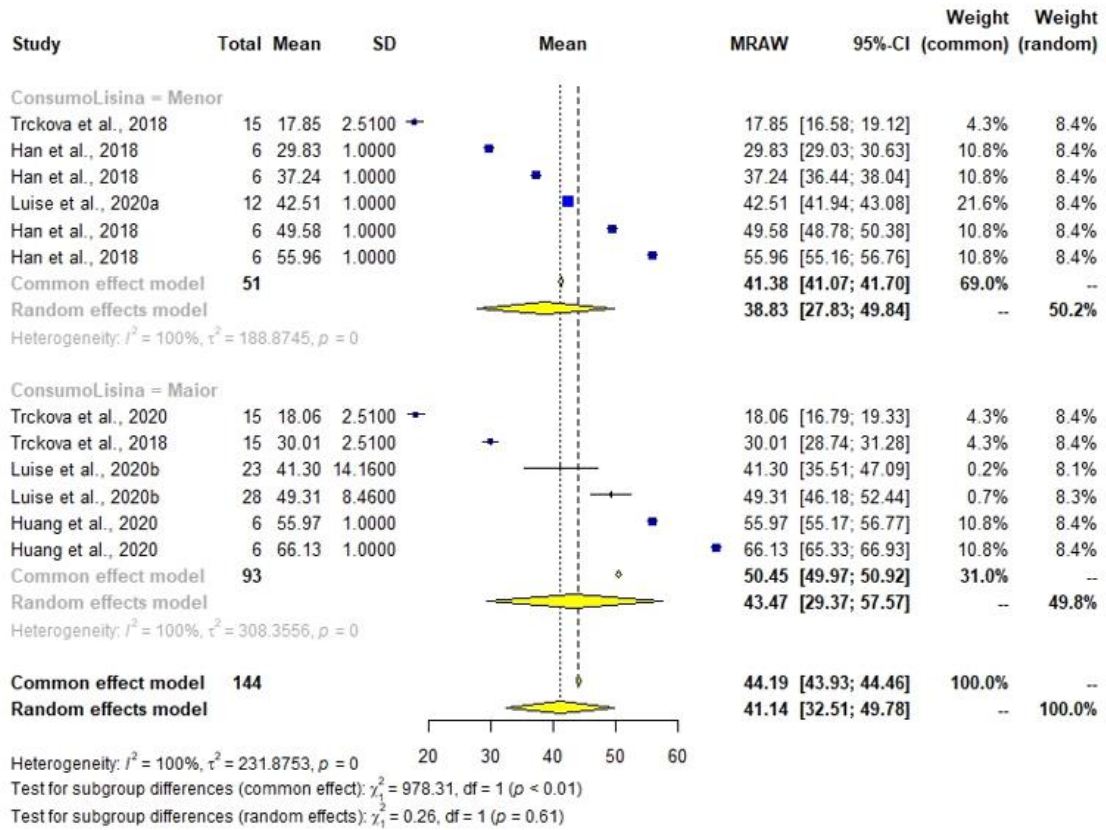
(b) filo Bacteroidetes



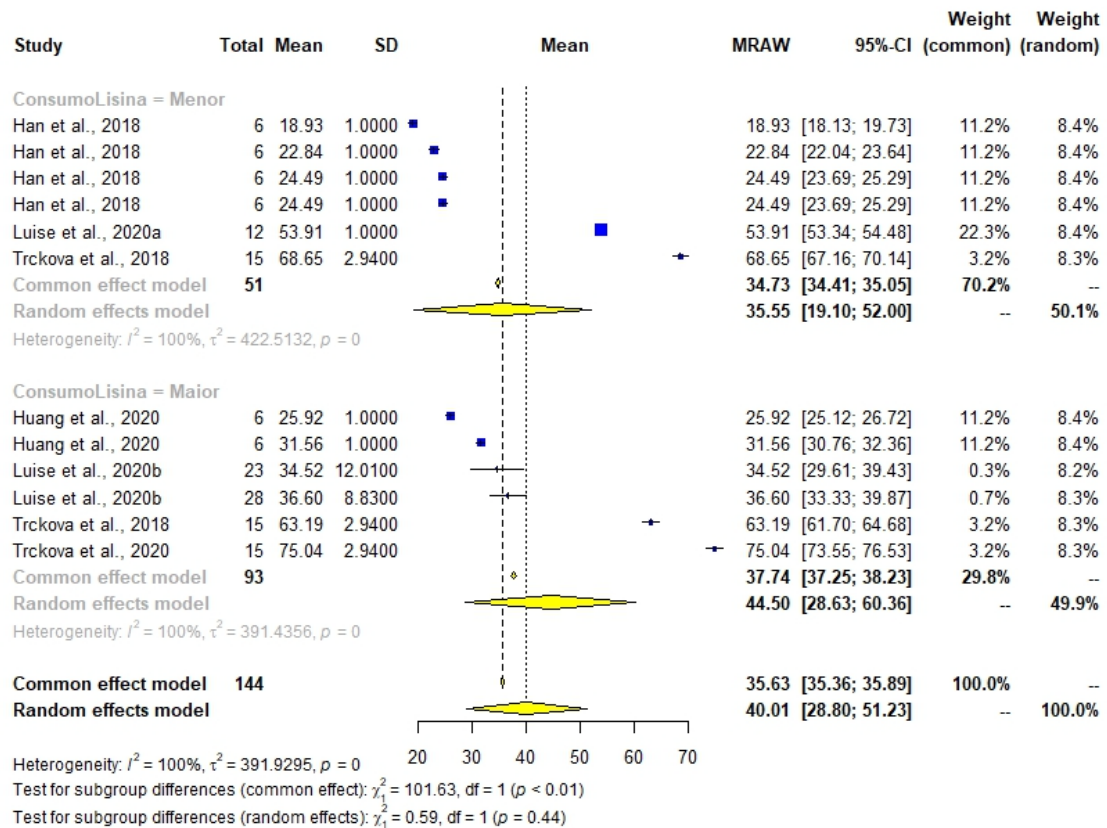
O subgrupo da relação do consumo de lisina pelo peso vivo metabólico estimado (g/kg PV^{0,75}) não apresentou efeito significativo nos filos da microbiota intestinal de leitões no período pós-desmame (Figura 6).

Figura 6. Forest plot do efeito da relação do consumo de lisina pelo peso vivo metabólico estimado ($\text{g/kg PV}^{0.75}$) na média geral da abundância dos (a) filo Firmicutes e (b) filo Bacteroidetes da microbiota intestinal de leitões desmamados.

(a) filo Firmicutes



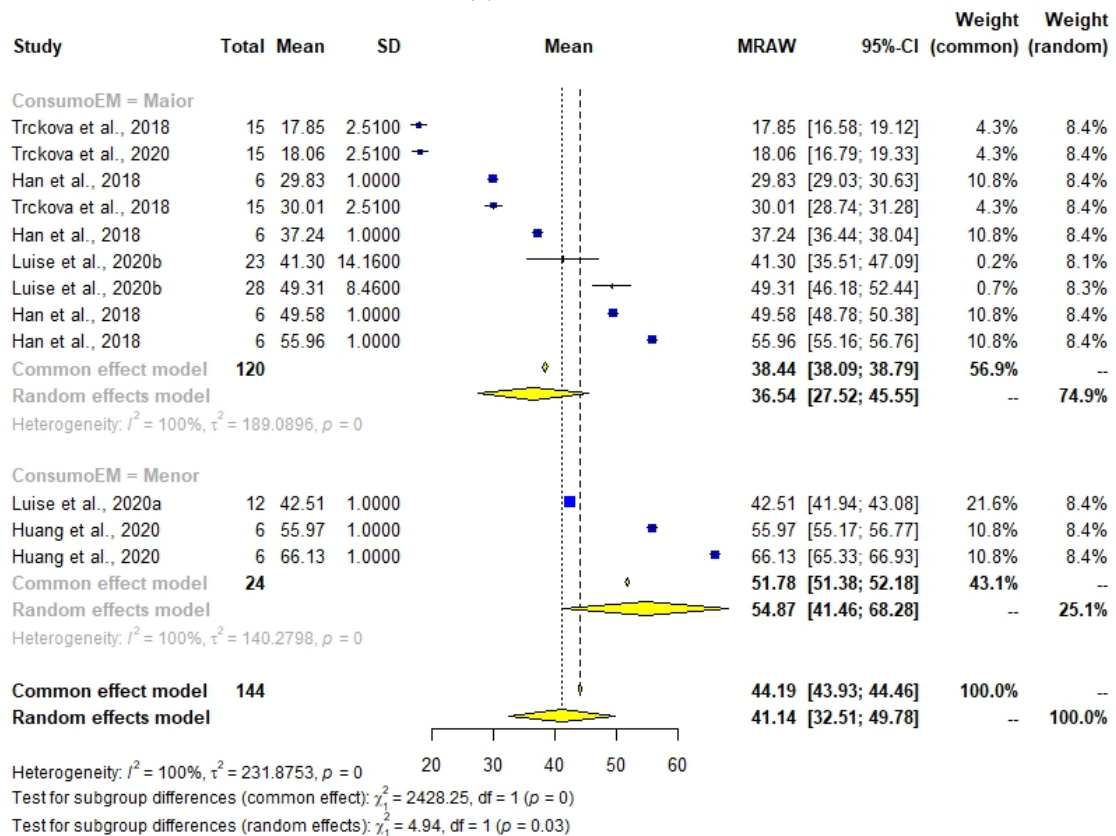
(b) filo Bacteroidetes



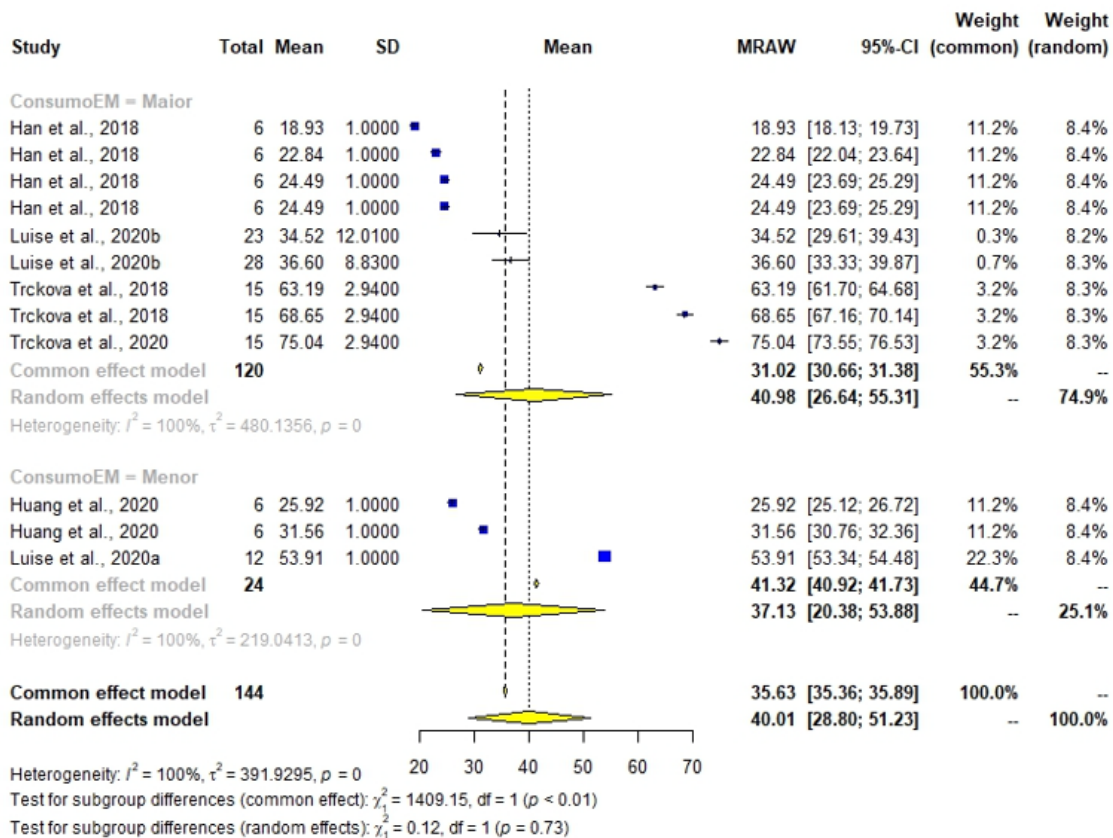
O subgrupo da relação do consumo de energia metabolizável por unidade de peso vivo metabólico estimado (kcal/kg $PV^{0,75}$), mostrou efeito significativo para os filios Firmicutes (Figura 7(a)). Leitões desmamados com maior consumo de energia metabolizável (kcal/kg $PV^{0,75}$) apresentaram em média 36,54% da composição da microbiota formada pelo filo Firmicutes, enquanto animais do subgrupo com consumo de energia metabolizável menor que 512 kcal/kg $PV^{0,75}$ apresentam em média 54,87% do filo Firmicutes em sua microbiota intestinal.

Figura 7. Forest plot do efeito da relação do consumo de energia metabolizável por unidade de peso vivo metabólico estimado (kcal/kg PV^{0,75}) na média geral da abundância do (a) filo Firmicutes e (b) filo Bacteroidetes na composição da microbiota intestinal de leitões desmamados.

(a) filo Firmicutes



(b) filo Bacteroidetes



4 DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE LEITÕES NO PÓS-DESMAME

O desmame é um dos eventos mais estressantes da vida de um suíno, contribuindo para disfunções intestinais e do sistema imunológico (CAMPBELL et al., 2013), que afetam a composição da microbiota intestinal. A composição da microbiota se diferencia ao longo dos segmentos do trato gastrointestinal e de acordo com a idade dos animais, com quantidades e tipos de bactérias distintas, influenciados pelo pH, disponibilidade de substratos e peristaltismo, sendo o intestino grosso e suas porções o local de maior proliferação bacteriana (HEO et al., 2012). Em amostras coletadas no reto de leitões desmamados os filos mais abundantes são Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (GUEVARRA et al., 2018).

Os Bacteroidetes consistem principalmente de bactérias gram negativas, características fermentativas e com capacidade de modular o sistema imune de forma benéfica (COSTELLO

et al., 2009), e os gêneros bacterianos prevalentes são *Bacteroides* e *Prevotella*. O filo Firmicutes contém os gêneros *Lactobacillus* e *Clostridium* que são imunomoduladores e também abrigam espécies relacionadas à indução de inflamação. O filo Proteobacteria pode ser um indicativo de uma comunidade microbiana instável, sendo parte a espécie *Escherichia coli*, considerada uma bactéria comensal e a sua presença em indivíduos assintomáticos pode ser habitual, entretanto em altas proporções podem estar associada a alterações funcionais do trato gastrointestinal e diarreias (SHIN et al., 2015). E o filo Actinobacteria engloba bactérias do gênero *Bifidobacterium* que possuem funções como a produção de vitaminas, a estimulação do sistema imunológico, a inibição de bactérias potencialmente patogênicas (COSTELLO et al., 2009).

A nível de gênero os mais frequentes e abundantes em leitões desmamados são *Prevotella* do filo Bacteroidetes, e *Lactobacillus* do filo Firmicutes (CHEN et al., 2017; GUEVARRA, et al., 2018). O gênero *Prevotella* possui associação com a fermentação de polissacarídeos não amiláceos derivados de plantas (IVARSSON et al., 2014), e o gênero *Lactobacillus* apresenta capacidade de consumir monossacarídeos e dissacarídeos derivados de plantas (SCHWAB e GÄNZLE, 2011). Uma maior abundância dos gêneros *Prevotella* e *Lactobacillus* em leitões desmamados, indica a adaptação à dieta basicamente formulada com ingredientes vegetais fornecida após o desmame.

4.2 EFEITO DE SUBSTÂNCIAS MODULADORAS DA MICROBIOTA INTESTINAL NA DIETA DE LEITÕES DESMAMADOS

Muitos dos problemas observados nos leitões recém desmamados são amenizados pelo fornecimento de dietas com adição de antibióticos promotores de crescimento e/ou óxido de zinco. Na suinocultura os antibióticos promotores de crescimento são utilizados para modular a microbiota intestinal, reduzindo e controlando o crescimento de potenciais bactérias patogênicas, e melhorar o desempenho produtivo (KIM et al., 2012). Com o aumento dos casos de resistência microbiana e do risco residual em produtos de origem animal, a União Europeia proibiu o uso profilático de antibióticos nas rações desde janeiro de 2006 e limitou o uso apenas para fins terapêuticos. O óxido de zinco, muito utilizado na prevenção da diarreia pós-desmame, é pouco absorvido pelo animal e excretado nos dejetos. Com a utilização dos dejetos como fertilizante, a concentração de zinco na camada superficial do solo aumenta, e o escoamento e a lixiviação levam a contaminação de águas subterrâneas e superficiais (BONETTI, et al., 2021).

Contudo, nos últimos anos o interesse na busca por alternativas que possam amenizar os impactos negativos do desmame nos leitões aumentou consideravelmente (HEO et al., 2012). Entre as alternativas apontadas estão os aditivos com efeito prebiótico, como a lactose, extratos vegetais e ácidos orgânicos, adicionados nas dietas de leitões. Esses aditivos têm mostrado efeitos benéficos, como a produção de substâncias antimicrobianas, melhora na saúde intestinal, equilíbrio da população microbiana e melhora no desempenho produtivo dos animais (KIM e ISAACSON, 2015).

Os prebióticos, substâncias alimentares não digestíveis ao organismo animal e que servem de nutriente para os microrganismos benéficos presentes no trato gastrointestinal, reduzindo a incidência de diarreias, a concentração de *E. coli*, e a mortalidade de leitões após o desmame (ZHAO et al. 2012). Os extratos vegetais como procianidinas de semente de uva (WEI et al., 2022) e extrato *Macleaya cordata* (LI et al., 2020) apresentam propriedades que inibem a colonização do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas (KEMPERMAN et al., 2010). Outra alternativa utilizada para evitar e tratar a diarreia pós-desmame são as substâncias húmicas, componentes da matéria orgânica natural no solo, água e sedimentos formadas por reações bioquímicas e químicas durante a decomposição e transformação de restos vegetais e microbianos (TRCKOVA et al., 2018). Os ácidos orgânicos melhoram o consumo de ração e reduzem a diarreia de leitões desmamados, por meio da acidificação do intestino e mantêm o equilíbrio da microbiota intestinal (HAN et al., 2018; PARTANEN e MROZ, 1999).

Apesar de a metanálise não indicar um efeito na composição dos filos da microbiota intestinal, todos os estudos selecionados na revisão sistemática mostraram uma melhora na saúde e morfologia intestinal e uma redução na diarreia com o uso das substâncias moduladoras da microbiota intestinal (Tabela 1) nas dietas de leitões no pós-desmame. Esses resultados mostram que são alternativas promissoras aos promotores de crescimento e óxido de zinco, reduzindo os riscos problemas de saúde pública e ambiental.

4.3 EFEITO DOS SUBGRUPOS NA MICROBIOTA INTESTINAL DE LEITÕES NO PÓS-DESMAME

Com o desmame, a composição da dieta fornecida aos leitões muda abruptamente, tanto em sua forma, quanto em sua composição com a introdução de alimentos complexos à base de vegetais, o que ocasiona mudanças na microbiota intestinal dos animais. Em todo o mundo, existem dois tipos de dietas tradicionais fornecidas aos suínos com base na disponibilidade dos ingredientes principais: uma dieta baseada em milho e farelo de soja, comum nas Américas do

Norte e do Sul, e uma dieta baseada em trigo, cevada e subprodutos da indústria alimentícia, comum na Europa e partes da China (VERSCHUREN, et al. 2018).

O trigo e a cevada são ingredientes com níveis mais altos de fibra dietética do que o milho (NRC, 2012). A fibra dos ingredientes vegetais é incorporada nas paredes celulares das plantas com polissacarídeos e lignina, que são resistentes às enzimas digestivas dos animais não-ruminantes que não conseguem digerir as ligações glicosídicas β -1,4. A fibra alimentar constituída por polissacarídeos não amiláceos (PNA) também é resistente à digestão dos suínos, e dependendo do tipo de cereal utilizado, pode ser fermentada pelas bactérias intestinais presentes no intestino grosso em monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (GRESSE et al., 2017). As dietas ricas em PNA reduzem o tempo de trânsito intestinal e o pH, aumentando os substratos que são lentamente degradados pela microbiota no intestino grosso (MURPHY et al., 2012), aumentando a abundância dos gêneros *Ruminococcus* e *Clostridium* do filo Firmicutes e o gênero *Bacteroides* do filo Bacteroidetes (ROBINSON et al., 1981).

O aumento na abundância do gênero *Prevotella*, pertencente ao filo Bacteroidetes, no período pós-desmame aumenta a capacidade de degradar os componentes das rações com ingredientes vegetais (LAMENDELLA et al., 2011). Como, por exemplo, os PNA da dieta em AGCC, como o acetato, o propionato e o butirato, evidenciando a influência da microbiota nas células epiteliais intestinais por meio de funções imunológicas e metabólicas. O butirato e o acetato regulam o metabolismo energético, preservando a imunidade da mucosa intestinal (DONOHOE et al., 2011; KAIKO et al., 2016). E o acetato melhora a integridade das células epiteliais e melhora a proteção contra infecções, contribuindo para a preservação da imunidade da mucosa através de células caliciformes (LEVY et al., 2017).

Já o aumento no filo Actinobacteria nas dietas do subgrupo das dietas à base de milho e soja, possivelmente foi influenciado pelo aumento na abundância do gênero *Bifidobacterium*, ligado a manutenção da saúde intestinal e sistema imunológico. Dietas com milho favorecem a produção de butirato, melhorando o desempenho de leitões desmamados (ZHAO et al., 2018). Dessa forma, a composição da dieta pode ser uma opção para modular a microbiota, melhorando a saúde, o bem-estar e a eficiência na digestão de nutrientes, por meio dos grãos de cereais utilizados nas dietas, diminuindo a dependência de antibióticos (DREW et al., 2002).

O desmame dos leitões é frequentemente acompanhado de distúrbios intestinais, como a diarreia pós-desmame, geralmente associada a um aumento da fermentação microbiana de proteínas não digeridas no trato gastrointestinal. O crescimento e a atividade de potenciais patógenos podem ser evitados limitando o suprimento de nutrientes. Desta forma, dietas com alto nível de proteína (maior que 20%) podem favorecer a proliferação de bactérias

fermentadoras de proteínas no intestino grosso do leitão, resultando em distúrbios intestinais e diarreia no pós-desmame (RIST et al., 2014).

O excesso de proteína na dieta passa para o intestino grosso, onde é fermentado pelas bactérias em nitrogênio amoniacal, putrescina, histamina, sulfeto de hidrogênio e outras substâncias tóxicas (WINDEY et al., 2012). Essas substâncias em contato com a mucosa intestinal aumentam a permeabilidade da barreira mucosa do intestino causando diarreia em leitões (XIA et al., 2022). Leitões desmamados que ingeriram uma quantidade maior de PB apresentam uma abundância maior do filo Firmicutes, que engloba o gênero *Clostridium*, potencialmente patogênico (ZHAO et al., 2019).

No entanto, dietas de baixa proteína podem não atender as necessidades de crescimento e desenvolvimento de leitões no período pós-desmame. Os aminoácidos que chegam no cólon, incluindo a lisina, também podem ser utilizados pelas bactérias para gerar produtos metabólicos, como os AGCC, que podem ser uma fonte de energia para os suínos (DAI et al., 2011).

A energia é o principal fator limitante ao desempenho animal e é o primeiro a ser considerado na formulação de dietas para animais. Embora não seja considerada um nutriente, provém de carboidratos, lipídeos e proteínas que geram energia ao serem digeridos e metabolizados pelos animais. Os suínos dependem do fornecimento de carboidratos não fibrosos para obtenção de energia, especialmente o amido, abundante em grãos de cereais, como o milho. A energia metabolizável do alimento é obtida descontando a energia perdida nas fezes e na urina dos animais. As bactérias presentes na microbiota intestinal possuem a capacidade de melhorar o potencial de extrair energia e nutrientes da nossa dieta (LEY et al., 2008). Em humanos o consumo de calorias em excesso leva à proliferação do filo Firmicutes, permitindo a extração e estocagem de nutrientes com maior eficiência, auxiliando no ganho de peso (TURNBAUGH et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

Os resultados da revisão sistemática e da metanálise deste estudo demonstraram que os principais filos que compõem a microbiota intestinal de leitões desmamados são Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria. Dietas com base nos ingredientes milho e soja apresentam menor média do filo Firmicutes na microbiota em relação às dietas com outros ingredientes. Animais com consumo de proteína por peso metabólico maior de 29 g/kg PV^{0,75} apresentam uma microbiota composta por 48,17% do filo Firmicutes e 28,88% do filo Bacteroidetes,

enquanto que para o consumo menor de 29 g/kg PV^{0,75} ocorre o contrário, sendo 31,18% do filo Firmicutes e 55,69% do filo Bacteroidetes.

REFERÊNCIAS

BONETTI, Andrea et al. Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 642, 2021.

CAMPBELL, Joy M.; CRENSHAW, Joe D.; POLO, Javier. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19, 2013.

CHEN, Limei et al. The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1688, 2017.

COSTELLO, Elizabeth K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **science**, v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.

DAI, Zhao-Lai; WU, Guoyao; ZHU, Wei-Yun. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 16, n. 5, p. 1768-1786, 2011.

DONOHOE, Dallas R. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. **Cell metabolism**, v. 13, n. 5, p. 517-526, 2011.

DREW, M. D. et al. Effect of dietary cereal on intestinal bacterial populations in weaned pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 82, n. 4, p. 607-609, 2002.

FOWLER, V.; GILL, B.. Voluntary food intake in the young pig. **BSAP Occasional Publication**, v.13, p.51-60, 1989.

GRESSE, Raphaële et al. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 10, p. 851-873, 2017.

GUEVARRA, Robin B. et al. The dynamics of the piglet gut microbiome during the

weaning transition in association with health and nutrition. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 9, p. 1-9, 2018.

HAN, Y. S. et al. Effects of dietary supplementation with combinations of organic and medium chain fatty acids as replacements for chlortetracycline on growth performance, serum immunity, and fecal microbiota of weaned piglets. **Livestock Science**, v. 216, p. 210-218, 2018.

HEO, GangJoon et al. Antimicrobial activity of thymol against pathogenic Gram-negative bacteria of fishes. **Philippine Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 2, 2012.

HEO, Jung M. et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013.

HUANG, Linli et al. Effect of fermented feed on growth performance, holistic metabolism and fecal microbiota in weanling piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 266, p. 114505, 2020.

IVARSSON, Emma. et al. Fermentable non-starch polysaccharides increases the abundance of Bacteroides–Prevotella–Porphyromonas in ileal microbial community of growing pigs. **animal**, v. 8, n. 11, p. 1777-1787, 2014.

KAIKO, Gerard E. et al. The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1708-1720, 2016.

KEMPERMAN, Robèr A. et al. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. **Microbiology**, v. 156, n. 11, p. 3224-3231, 2010.

KIM, Hyeun Bum et al. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 38, p. 15485-15490, 2012.

KIM, Hyeun Bum; ISAACSON, Richard E. The pig gut microbial diversity: understanding

the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. **Veterinary microbiology**, v. 177, n. 3-4, p. 242-251, 2015.

LAMENDELLA, Regina et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. **BMC microbiology**, v. 11, p. 1-17, 2011.

LARSEN, Olaf FA; CLAASSEN, Eric. The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 2183, 2018.

LEVY, Maayan; BLACHER, Eran; ELINAV, Eran. Microbiome, metabolites and host immunity. **Current opinion in microbiology**, v. 35, p. 8-15, 2017.

LEY, Ruth E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008.

LI, Yuan et al. Effects of *Macleaya cordata* extract on small intestinal morphology and gastrointestinal microbiota diversity of weaned pigs. **Livestock Science**, v. 237, p. 104040, 2020.

LIM, Efrem S.; WANG, David; HOLTZ, Lori R. The bacterial microbiome and virome milestones of infant development. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 10, p. 801-810, 2016.

LUISE, Diana et al. The supplementation of a corn/barley-based diet with bacterial xylanase did not prevent diarrhoea of ETEC susceptible piglets, but favoured the persistence of *Lactobacillus reuteri* in the gut. **Livestock Science**, v. 240, p. 104161, 2020a.

LUISE, Diana et al. Effects of E. coli bivalent vaccine and of host genetic susceptibility to E. coli on the growth performance and faecal microbial profile of weaned pigs. **Livestock Science**, v. 241, p. 104247, 2020b.

MURPHY, Pdraigin et al. Effects of cereal β -glucans and enzyme inclusion on the porcine gastrointestinal tract microbiota. **Anaerobe**, v. 18, n. 6, p. 557-565, 2012.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of swine**, 2012.

PARTANEN, Krisi H.; MROZ, Zdzislaw. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition research reviews**, v. 12, n. 1, p. 117-145, 1999.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2022. Disponível em: <https://www.Rproject.org>

RIST, Vanessa TS et al. Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets. **Anaerobe**, v. 25, p. 72-79, 2014.

ROBINSON, Isadore M et al. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 4, p. 950-955, 1981.

SCHWAB, Clarissa; GÄNZLE, Michael. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. **FEMS microbiology letters**, v. 315, n. 2, p. 141-148, 2011.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

TRCKOVA, Martina et al. The effect of leonardite and lignite on the health of weaned piglets. **Research in veterinary science**, v. 119, p. 134-142, 2018.

TURNBAUGH, Peter J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

VERSCHUREN, Lisanne MG et al. Fecal microbial composition associated with variation in feed efficiency in pigs depends on diet and sex. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 4, p. 1405-1418, 2018.

WEI, Xinxin et al. Grape seed procyanidins improve intestinal health by modulating gut microbiota and enhancing intestinal antioxidant capacity in weaned piglets. **Livestock Science**, v. 264, p. 105066, 2022.

WEISS, Eva et al. Wheat and barley differently affect porcine intestinal microbiota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2230-2239, 2016.

WINDEY, Karen; DE PRETER, Vicky; VERBEKE, Kristin. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular nutrition & food research**, v. 56, n. 1, p. 184-196, 2012.

XIA, Jiangying et al. Research progress on diarrhoea and its mechanism in weaned piglets fed a high-protein diet. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 106, n. 6, p. 1277-1287, 2022.

ZHAO, Jianfei et al. Dietary protein and gut microbiota composition and function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 20, n. 2, p. 145-154, 2019.

ZHAO, Jinbiao et al. Dietary fiber increases butyrate-producing bacteria and improves the growth performance of weaned piglets. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 30, p. 7995-8004, 2018.

ZHAO, P.Y. et al. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, 90, 833-839, 2012.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição microbiota intestinal dos leitões possui influência na saúde, nutrição e desempenho dos animais. Modular a microbiota intestinal por meio da alimentação ou aditivos mostra resultados promissores, contribuindo para a saúde e desempenho, a redução da diarreia pós-desmame e também no uso de antimicrobianos na produção animal. Mais estudos são necessários para entender melhor as interações e os mecanismos envolvidos entre a composição da dieta e a composição bacteriana da microbiota intestinal de leitões.

O fornecimento de suplemento lácteo para leitões no período pós-desmame não afetou o desempenho, o índice de diarreia ou o comportamento. Leitões que receberam o suplemento lácteo tiveram maior consumo de ração no segundo e terceiro dias após o desmame, e também apresentaram maior comprimento das vilosidades do duodeno e placas de Peyer maiores, indicando melhora do desempenho e saúde intestinal.

No estudo de metanálise a adição de substâncias moduladoras da microbiota intestinal na dieta não mostrou efeitos sobre a abundância dos filos na microbiota intestinal de leitões desmamados. Dietas com aveia, cevada, trigo e arroz mostraram efeito na abundância dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria. Leitões que ingeriram uma maior quantidade de proteína apresentaram uma abundância maior do filo Firmicutes, enquanto nos com menor consumo de proteína o filo Bacteroidetes foi mais abundante. Animais com consumo de energia metabolizável menor apresentaram maior abundância do filo Firmicutes em sua microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER, Nick. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 1, p. 19-33, 2014.

BARSZCA, Marcin; SKOMIAŁ, Jacek. The development of the small intestine of piglets – chosen aspects. **Journal of Animal and Feed Sciences**. 20:3–15, 2011.

BERG, Gabriele et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, p. 1-22, 2020.

BONETTI, Andrea et al. Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 642, 2021.

BROWN, David 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.

BURKHOLDER, Kristin. M. et al. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers. **Poultry Science**, v. 87, n. 9, p. 1734-1741, 2008.

CAI Hui et al. Genome sequence and comparative genome analysis of lactobacillus casei: insights into their niche-associated evolution. **Genome Biology and Evolution**, v.1, p.239–57, 2009.

CAMPBELL, Joy M.; CRENSHAW, Joe D.; POLO, Javier. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19, 2013.

CAO, Kun-Fang et al. Effect of dietary protein sources on the small intestine microbiome of weaned piglets based on high-throughput sequencing. **Letters in applied microbiology**, 62(5), 392-398, 2016.

CHELAKKOT, Chaithanya et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. **Experimental & Molecular Medicine**, 50(2), e450-e450, 2018.

COSTELLO, Elizabeth K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **science**, v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.

EWING, Wesley N. **The living gut**. 2 nd edition, Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2009.

FARQUHAR, Marilyn G.; PALADE, George E. Junctional complexes in various epithelia. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 2, p. 375-412, 1963.

FRESE, Steven A et al. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. **Microbiome**, v.3(1), 2015.

function and absorption in pigs after weaning: a review. **British Journal of Nutrition**, 105(7), 967-981, 2011.

FURBEYRE, Hauteclaire et al. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. **animal**, v.11(2), p.183-192, 2017.

GUEVARRA, Robin B et al. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 10(1), 1, 2019.

GUEVARRA, Robin B et al. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 9(1), 54, 2018.

GUMBINER, Barry. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 253, n. 6, p. C749-C758, 1987.

HAN Geon G. et al. Evaluating the association between body weight and the intestinal microbiota of weaned piglets via 16S rRNA sequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101:5903–11, 2017.

HEDEMANN, Mette.; JENSEN, 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.

HEO, GangJoon et al. Antimicrobial activity of thymol against pathogenic Gram-negative bacteria of fishes. **Philippine Journal of Veterinary Medicine**, 49(2), 2012.

HU, Chun-Hong et al. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1094-1101, 2013.

- JOHNSON, Jay S.; SAPKOTA, Avi; LAY JR, Donald C. Rapid cooling after acute hyperthermia alters intestinal morphology and increases the systemic inflammatory response in pigs. **Journal of Applied Physiology**, 120, 1249–1259, 2016.
- KELLY, Denise; COUTTS, Alistair G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**, v. 66, n. 2, p. 161- 167, 2000.
- KIM, Hyeun Bum; ISAACSON, Richard E. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. **Veterinary Microbiology**, 177(3-4), 242–251, 2015.
- KONG, Shanshan; ZHANG, Yanhui H.; ZHANG, Weiqiang. Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids. **BioMed research international**, v. 2018, id. 2819154, 2018.
- LALLÈS, Jean-Paul et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, v. 53, n. 4, p. 301-316, 2004.
- LAMENDELLA, Regina et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. **BMC Microbiology**, v.11, 103, 2011.
- LE DIVIDICH, J., e SÈVE, B. Energy requirement of the young piglet. In **The Weaner Pig**. CAB International, Oxford, 2000.
- MCCRACKEN, Barbara A., et al. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 3, p. 613-619, 1999.
- MIDDELKOOP, Anouschka et al. Dietary diversity affects feeding behaviour of suckling piglets. **Applied Animal Behaviour Science**, 205, 151-158, 2018.
- MITIC, Laura L.; VAN ITALLIE, Christina M.; ANDERSON, James M. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 2, p. G250-G254, 2000.
- MOESER, Adam J.; POHL, Calvin S.; RAJPUT, Mrigendra. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. **Animal Nutrition**, 3:313–21, 2017.

OHNO, Hiroshi. Intestinal M cells. **The Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 151-160, 2016.

PACHA, Jirì. Development of intestinal transport function in mammals. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1633-1667, 2000.

PIÉ, Sandrine et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 641-647, 2004.

PLUSKE, John R.; TURPIN, Diana L.; KIM, Jae-Cheol. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. **Animal Nutrition**, 4(2), 187-196, 2018.

PLUSKE, John R. et al. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. **British Journal of Nutrition**, 76: 409–422, 1996.

POWELL, Don W. Barrier function of epithelia. **American Journal of Physiology**, 241, G275–G288, 1981.

QI, Zhen; CHEN, Ye-Guang. Regulation of intestinal stem cell fate specification. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 6, p. 570-578, 2015.

RIMOLDI, Monica et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. **Nature immunology**, v. 6, n. 5, p. 507-514, 2005.

SCHWAB, Clarissa; GÄNZLE, Michael. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. **FEMS Microbiology Letters**, 315:141–8, 2011.

SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS Biology**, 14(8): e1002533, 2016.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

SMITH Feli et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, 298: G352-G363, 2010.

SPITZ, James C. et al. Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress. **Critical care medicine**, 24(4), 635-641, 1996.

- STARKE, Ingo C. et al. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. **FEMS microbiology ecology**, 87(2), 416-427, 2014.
- SU, Liping et al. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 551-563, 2009.
- TAN Zhen et al. Metagenomic analysis of Cecal microbiome identified microbiota and functional capacities associated with feed efficiency in landrace finishing pigs. **Frontiers in Microbiology**, 8:1546, 2017.
- TAO, Nannan et al. Structural determination and daily variations of porcine milk oligosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58, n. 8, p. 4653-4659, 2010.
- USHIDA, Kazunari et al. Decreasing traits of fecal immunoglobulin A in neonatal and weaning piglets. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 8, p. 849-852, 2008.
- VAN DER MEULEN, Jan. et al. Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. **Animal**, v. 4, n. 10, p. 1653-1661, 2010.
- WANG, Jing 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. 4, 2016.
- WIJTEN, Peter JA; VAN DER MEULEN, Jan; VERSTEGEN, Martin WA. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 7, p. 967-981, 2011.
- WU, Fei et al. Expression of proteins in intestinal middle villus epithelial cells of weaning piglets. **Frontier Bioscience**, v. 22, p. 539-57, 2017.
- XIONG, Xia. et al. Differential expression of proteins involved in energy production along the crypt-villus axis in early-weaning pig small intestine. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 4, p. G229-G237, 2015.
- XIONG, Xia et al. Dietary lysozyme supplementation contributes to enhanced intestinal functions and gut microflora of piglets. **Food & Function**, 10(3), 1696-1706, 2019a.

XIONG, Xia et al. Nutritional intervention for the intestinal development and health of weaned pigs. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 46, 2019b.

YANG, Huansheng et al. Energy metabolism in intestinal epithelial cells during maturation along the crypt-villus axis. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

ZHANG Lingli et al. Effects of dietary fibre source on microbiota composition in the large intestine of suckling piglets. **FEMS Microbiology Letters**, 363:1–6, 2016.

ZHAO Wenjing et al. The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. **PLoS ONE**, 10(2): e0117441, 2015.

ZHOU, J. et al. Ethanolamine metabolism in the mammalian gastrointestinal tract: mechanisms, patterns, and importance. **Current molecular medicine**, v. 17, n. 2, p. 92- 99, 2017.

ANEXOS

1-APROVAÇÃO CEUA:



Comissão de Ética no Uso de Animais
da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "IMPLICAÇÕES DO FORNECIMENTO, À LIVRE ESCOLHA, DE SUPLEMENTO LÁCTEO PARA LEITÕES NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO PÓS-DESMAMA: DESEMPENHO, COMPORTAMENTO, HISTOLOGIA E MICROBIOLOGIA INTESTINAL", protocolada sob o CEUA nº 9669161020 (ID 003269), sob a responsabilidade de **Vladimir de Oliveira e equipe; Daniela Regina Klein; Vladimir de Oliveira; Luciane Inês Schneider; Júlia de Camargo da Silva; Henrique da Costa Mendes Muniz; Josué Sebastião Kunzler; Arlei Rodrigues Bonet de Quadros** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 01/12/2020.

We certify that the proposal "IMPLICATIONS OF PROVIDING FREE CHOICE DAIRY SUPPLEMENT FOR PIGLETS IN THE POST-WEANING TRANSITION: PERFORMANCE, BEHAVIOUR, HISTOLOGY AND INTESTINAL MICROBIOLOGY", utilizing 144 Swines (males and females), protocol number CEUA 9669161020 (ID 003269), under the responsibility of **Vladimir de Oliveira and team; Daniela Regina Klein; Vladimir de Oliveira; Luciane Inês Schneider; Júlia de Camargo da Silva; Henrique da Costa Mendes Muniz; Josué Sebastião Kunzler; Arlei Rodrigues Bonet de Quadros** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 12/01/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2020](#) a [08/2022](#) Área: [Departamento de Zootecnia](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [21 a 56 dias](#)

N: [144](#)

Linhagem: [Híbrido comercial](#)

Peso: [6 a 25 kg](#)

Local do experimento: Laboratório de Suinocultura da UFSM

Santa Maria, 01 de dezembro de 2020

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria