

**EFEITO DE MANANOLIGOSSACARÍDEOS SOBRE PARAMETROS
ZOOTÉCNICOS E HISTOMORFOMÉTRICOS DUODENAIIS DE RATOS
WISTAR**

GABRIEL ZANUTO SAKITA

**EFEITO DE MANANOLIGOSSACARÍDEOS SOBRE PARAMETROS
ZOOTÉCNICOS E HISTOMORFOMÉTRICOS DUODENAIIS DE RATOS
WISTAR**

GABRIEL ZANUTO SAKITA

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Sakita, Gabriel Zanuto

Efeito de mananoligossacarídeos sobre parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos Wistar / Gabriel Zanuto Sakita. -- Presidente Prudente, 2014.
72 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste: Presidente
Prudente – SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Hermann Bremer Neto

1. Prebióticos. 2. Desempenho animal 3. Vilosidades
intestinais. 4. Alimentos funcionais. I. Título.

GABRIEL ZANUTO SAKITA

**EFEITO DE MANANOLIGOSSACARÍDEOS SOBRE PARAMETROS
ZOOTÉCNICOS E HISTOMORFOMÉTRICOS DUODENAIIS DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 12 de Março 2014.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dra. Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá – UEM
Maringá - PR

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATORIAS

Primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado me dando sabedoria, saúde e força para enfrentar os momentos difíceis;

Aos meus pais, Nelson e Elisabete, pelo apoio, confiança e companheirismo. Não sei o que seria de mim sem vocês, jamais conseguirei retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim. Tenho muito orgulho de ter vocês como meus pais;

Ao meu irmão, Daniel, pelo companheirismo, confiança e ensinamentos passados. Pessoa que sempre esteve me ajudando a enfrentar as dificuldades e que será, sempre, uma referencia para que eu possa enfrentar os longos caminhos a serem percorridos. Tenho muito orgulho em dizer que você sempre será meu espelho;

A minha namorada, Mayla, por me apoiar nas decisões mais difíceis e sempre estar ao meu lado tanto nos momentos felizes como nos tristes. Pelo carinho, amor incondicional, sinceridade e acima de tudo por sua amizade. Você é muito importante para mim;

A memória de meus avós, Hissao Sakita e Maria Aparecida de Carvalho Zanuto, agradeço muito pelos conselhos e ensinamentos. Guardo a memória de vocês em meu coração;

A toda minha família, pela amizade e força que me deram no decorrer dessa caminhada.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, pela confiança, dedicação, ensinamentos, paciência e acima de tudo, pela amizade, sem o qual nada disso seria possível;

Aos meus pais, Nelson e Elisabete, por me darem condições para que conseguisse finalizar essa etapa da minha vida. Com certeza vocês são mais que responsáveis por esta conquista e através de vocês, mais um sonho está sendo realizado;

Aos docentes, Prof. Dr. Rogério Giuffrida, Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches, Prof^a. Dra. Caliê Castilho, Prof^a. Dra. Cecília Braga Laposy e Prof. Dr. Vamilton Álvares Santarém, por me ajudarem no decorrer do projeto, pelos ensinamentos, pela amizade e por disponibilizarem os laboratórios para a realização das análises;

A todos os Docentes do Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista, pela amizade, ensinamentos e incentivos;

Aos discentes do Mestrado em Ciência Animal, principalmente Soraia Younan, pela amizade e ajuda na realização de todas as etapas do experimento;

Aos alunos de graduação dos cursos de Medicina, Fisioterapia, Ciências Biológicas e Medicina Veterinária, que nos deram apoio durante o experimento;

Aos colaboradores do Biotério Central de Produção e Experimentação Animal, pela paciência, amizade e colaboração;

A todos os colaboradores dos laboratórios que nos ajudaram na realização das análises laboratoriais.

A todos o meu muito obrigado!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Efeito de mananoligossacarídeos sobre parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos Wistar

Alimentos funcionais ou nutracêuticos são definidos como aqueles que em virtude de componentes fisiologicamente ativos, promovem benefícios para a saúde. Dentre esses alimentos encontram-se os prebióticos. Os prebióticos são definidos como compostos alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente a proliferação e/ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, inibindo a multiplicação de patógenos e garantindo benefícios a saúde do hospedeiro. Atualmente, estes compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em iminente condição de estresse. O objetivo do projeto de pesquisa foi avaliar a utilização de três diferentes tipos de prebióticos, Bio-MosTM, ActigenTM e ImmunowallTM, a base de mananoligossacarídeos, que são comercializados no mercado, sobre os parâmetros de consumo acumulado de ração, percentual de ganho de peso, índice conversão alimentar, coeficiente de eficiência alimentar, altura e área das vilosidades, profundidade das criptas e contagem de células caliciformes duodenais de ratos albinos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar. O estudo foi realizado para comparar qual produto apresenta maiores benefícios sobre o organismo animal.

Palavras chave: Alimentos funcionais. Prebióticos. Desempenho animal. Vilosidades intestinais.

ABSTRACT

Effect of mannan-oligosaccharides on zootechnical and duodenal histomorphometric parameters in Wistar rats

Functional and nutraceuticals foods are defined as those which by virtue of physiologically active components, promote health benefits. Among these foods are prebiotics. Prebiotics are defined as non-digestible food compounds that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth and/or activity of populations of desirable bacteria in the colon, inhibiting the multiplication of pathogens and ensuring benefits to host health. Currently, these compounds have been used as an alternative to growth promoters in order to maintain the beneficial balance of intestinal microbiota, especially in young animals or in imminent stress condition. The objective of the research project was to evaluate the use of three different types of prebiotics, Bio-MosTM, ActigenTM e ImmunowallTM, based MOS, which are sold in the market, on cumulative feed intake, percentage of weight gain, feed conversion ratio, feed efficiency, villus height and area, crypt depth, and goblet cell counting of albino rats (*Rattus norvegicus*) Wistar. The study was conducted to compare the product which has greater benefits to the animal organism.

Key words: Functional foods. Prebiotics. Animal performance. Intestinal villus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2 HIPÓTESES E OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Antibióticos	14
3.1.1 Mecanismos de ação.....	16
3.2 Alimentos Funcionais	17
3.3 Prebióticos.....	18
3.3.1 Mananoligossacarídeos (MOS)	20
3.3.2 Mecanismos de ação.....	21
3.3.3 Melhora nos parâmetros zootécnicos.....	22
3.3.4 Modificações anatômicas do trato gastrointestinal	24
3.3.5 Efeitos imunoestimulatórios.....	25
3.3.6 Diminuição do risco de câncer de cólon	26
REFERÊNCIAS.....	28
4 ARTIGO CIENTÍFICO	36
ANEXO A - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).....	62
ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a Qual o Artigo Será Submetido.....	64

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Após o nascimento, as superfícies e mucosas dos animais, que, em condições fetais, são estéreis, rapidamente sofrem colonização por diversos micro-organismos. Destes, alguns são úteis e outros nocivos. A microbiota útil auxilia na digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminui, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (ROY; GIBSON, 1999). A nociva pode causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades. Em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio, no entanto, em condições de estresse, as populações úteis diminuem e as nocivas se proliferam, o que reflete negativamente sobre a saúde e o desempenho animal (MATHEW et al., 1993).

Segundo estudos, a microbiota intestinal inicia um importante papel na resistência de doenças entéricas por infecção ou por colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal, por inibirem a multiplicação de agentes patogênicos, trazendo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Podem ser citados como exemplo quadros de diarreia que, quando estabelecido no animal, sua principal consequência é a má absorção intestinal de nutrientes, levando à queda na taxa de crescimento (GORBACH, 2000; ASAHARA et al., 2004).

Devido a esses problemas, os antibióticos são rotineiramente utilizados em doses subterapêuticas para controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo, promovendo melhoras nos índices zootécnicos e maximizando a produção (CONNOLLY, 2001).

No entanto, depois de muitos anos de uso como aditivo em rações, os antibióticos passaram a ser vistos como fatores de risco para a saúde humana, sofrendo contestações pela possibilidade de deixar resíduos nos alimentos de origem animal, utilizados na alimentação humana, que podem ser os próprios aditivos ou seus metabólitos e pela possibilidade de levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada em animais e humanos (PELICANO; SOUZA, 2003).

Baseando-se nos conceitos de segurança alimentar, os prebióticos, produtos alternativos aos promotores de crescimento, foram pesquisados e desenvolvidos (MILTENBURG, 2000). O uso destes produtos visa, igualmente aos promotores de crescimento, obterem o máximo desempenho produtivo animal, com

o diferencial de disponibilizar ao mercado um produto final sem risco a saúde humana (SILVA; NÖRNBERG, 2003). Vale ressaltar também que, essas alternativas aos antibióticos devem ser capazes de alterar o pH intestinal, manter as mucinas protetoras do intestino, selecionar organismos benéficos ou atuar contra patógenos, assim como aumentar a fermentação ácida, a absorção de nutrientes e a resposta imune humoral (FERKET, 2004).

Os prebióticos são compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados pelos micro-organismos do trato gastrointestinal e que podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela por fontes exógenas. Proporcionam efeito benéfico ao hospedeiro por estimularem seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um limitado número de bactérias no cólon e por serem capazes de proporcionar um ambiente saudável (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROY; GIBSON, 1999).

Os prebióticos são considerados ingredientes funcionais, uma vez que exercem influência sobre processos fisiológicos no organismo, resultando em melhoria da saúde e em redução no risco de diversas doenças (KAUR; GUPTA, 2002; PHILLIPS; OGASAWATA; USHIDA, 2008).

O consumo regular de prebiótico pode reduzir a multiplicação de micro-organismos patogênicos no intestino, pois como é fermentado no intestino grosso, ele se converte em nutrientes que serão utilizados pelas bactérias benéficas, proporcionando um aumento na microbiota bacteriana e garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Além disso, outros efeitos benéficos à saúde do hospedeiro são associados ao consumo de prebióticos, como por exemplo, maior absorção de cálcio e, possivelmente, o metabolismo lipídico e redução do risco de câncer de cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995; CHARALAMPOPOULOS; PANDIELLA; WEBB, 2003; BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; SAAD, 2006).

Não se sabe ao certo se a utilização dos prebióticos representa uma alternativa aos antibióticos com relação ao aumento da produtividade animal. Assim, conhecimentos que possam elucidar estes fatos, juntamente com o conhecimento dos mecanismos de ação dos prebióticos e seus efeitos sobre o organismo e na prevenção de doenças são de grande interesse da nutrição animal para comprovar a eficácia desses aditivos, assim como reduzir a utilização de antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento, por estas representarem um risco para

a saúde animal e também humana. Além disso, é de extrema importância o conhecimento sobre qual prebiótico apresenta melhores resultados, devido à existência de vários tipos que são comercializados no mercado.

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Diversos prebióticos, a base de mananoligossacarídeos (MOS), são comercializados no mercado, ou então incorporados em produtos destinados à nutrição animal, com o propósito de aumentar a produtividade (desempenho) animal. Esse aumento pode ser decorrente de ações desses aditivos sobre o organismo do hospedeiro, tais como o aumento da absorção intestinal de nutrientes, que pode estar relacionada com o aumento do tamanho e da área das vilosidades intestinais, proporcionando uma maior superfície de contato, elevando dessa forma a absorção dos nutrientes; a ação dos aditivos sobre a microbiota intestinal, ou seja, modulando a população bacteriana, aumentando o crescimento e/ou a atividade das bactérias benéficas e diminuindo a colonização das bactérias patogênicas que contenham fimbrias tipo 1 pela capacidade de aglutinação ou agregação da manose sobre esse tipo de fímbria, prevenindo o desenvolvimento de patologias digestivas que podem atrapalhar o desempenho animal; com o crescimento das bactérias benéficas produtoras de ácidos orgânicos podem ocorrer indiretamente um estímulo do sistema imune pela produção de substâncias com propriedades imunoestimulatórias, aumentando a produção de células imunes.

Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar a utilização de três diferentes tipos de prebióticos, a base de mananoligossacarídeos, e comercializados no mercado, sobre os parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos Wistar. O estudo foi realizado para comparar qual produto apresenta maiores benefícios sobre o organismo animal.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antibióticos Promotores de Crescimento

Os antimicrobianos são produzidos por micro-organismos visando garantir sua proteção, desenvolvimentos e perpetuação da espécie. O homem usa a capacidade que alguns micro-organismos possuem de produzir antibióticos, com fins terapêuticos (PALERMO, 2006). Inicialmente a utilização de antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) tinha o intuito de prevenir enfermidades, porém, com o passar do tempo, começaram a ser usados também como promotores de crescimento. Nos Estados Unidos e alguns outros países, os antimicrobianos têm sido usados como promotores de crescimento na produção animal a mais de 50 anos (DIBNER; RICHARDS, 2005).

Os antibióticos são utilizados na alimentação animal, em doses subterapêuticas, para controle de infecções bacterianas e também como promotores de crescimento (RUSSEL; HOULIHAN, 2003). Na nutrição de suínos, os antibióticos melhoram a taxa de crescimento e a eficiência alimentar, reduz a mortalidade e morbidade e melhora os índices reprodutivos (CROMWELL, 2002). Na dieta de frangos, os antibióticos são usados como promotores de crescimento, pois promovem uma melhoria no ganho de peso e na eficiência alimentar (MATEOS; GONZÁLES-ALVARADO; LÁZARO, 2004).

Um grande número de substâncias teve sua eficácia comprovada em melhorar a produtividade dos animais ao longo das últimas cinco décadas e seu uso como aditivos de rações é generalizado. A melhoria no desempenho dos animais é atribuída à ação desses produtos sobre os micro-organismos patogênicos da microbiota intestinal (MENTEN, 2001).

A constante exposição dos animais a estes produtos pode levar a seleção de uma biota resistente. A partir da década de 80, pesquisadores começaram a notar que determinadas cepas bacterianas haviam se tornado resistentes aos antibióticos utilizados na nutrição animal e que o uso continuado de antimicrobianos promotores de crescimento, servia para expandir um “pool” de genes de resistência na natureza, sendo recomendada a rotação de produtos. A grande preocupação é que bactérias resistentes em animais de produção possam contribuir para a resistência aos antibióticos em humanos (SADER, 2004). A

resistência se desenvolve quando uma bactéria sobrevive à exposição de um antibiótico que normalmente mata a população bacteriana. Normalmente ocorre uma mutação que permite a sobrevivência da bactéria exposta ao antibiótico (EDENS, 2003).

Por este motivo, tornou-se crescente a restrição ou proibição de uso dos antibióticos como promotores de crescimento nas rações animais em vários países do mundo, sendo que na Europa já estão sendo proibidos os usos deste tipo de substância, tais como: virgiamicina, bacitracina de zinco, espiramicina e tilosina (BEST, 1999). Langhout (2005) relatou que a retirada gradativa dos antimicrobianos promotores de crescimento de dietas de frangos, reduziria o desempenho técnico e a lucratividade do setor avícola. Estas restrições por parte dos importadores e os impactos destas alterações no custo de produção, tem levado os nutricionistas a pesquisar alternativas que auxiliem na melhora do desempenho dos animais, mas que sejam inócuos para o animal e para o homem (DIBNER; RICHARDS, 2005).

As pesquisas passaram a ter um novo enfoque visando desenvolver alternativas, onde que os mecanismos de ação teriam que ser no sentido da não eliminação de biotas e o conseqüente aparecimento de resistência, mas sim na ação competitiva, isto favorece a multiplicação de micro-organismos que produzem substâncias antimicrobianas capazes de aderir-se a mucosa intestinal a fixação de bactérias enteropatogênicas (AHMAD, 2006).

Com a associação do uso de promotores de crescimento, a indução de resistência cruzada por bactérias patogênicas e reações de hipersensibilidade ou câncer, em virtude da presença de seus resíduos na carne, tem ocorrido pressão para o banimento desses produtos da alimentação animal (MENTEN, 2002). A União Europeia, uma das maiores importadoras de frango brasileiro, proibiu o uso de promotores de crescimento antimicrobianos na alimentação animal a partir de janeiro de 2006, permitindo somente a utilização dos ionóforos monensina e salinomina como agentes anticoccidianos (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003).

No Brasil, o Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (MARA), proibiu o uso de alguns antibióticos. A Portaria n 159, MARA, 1992, vetou o uso de antimicrobianos para ação de aditivos sistêmicos, promotores de crescimento ou conservantes para Tetraciclinas, Penicilinas, Cloranfenicol e Sulfonamidas. No ofício circular 19/98 de 16/11/98 o MARA, suspendeu o uso de Avoparcina e na Portaria 448 de 10/09/98 o MARA, proibiu a fabricação, importação e uso do Cloranfecinol,

Furazolidona e Nitrofurazona. A Instrução Normativa n 38 de 08/05/02 do Ministério da Agricultura estabeleceu a proibição de nitrofuranos na pecuária (LODDI, 2003).

3.1.1 Mecanismos de ação

A ação dos antibióticos ocorre ao nível do lúmen intestinal, exercendo ali sua função primordial. Tem sido atribuído efeitos a nível de metabolismo, tal como ativação do anabolismo proteico pela tetraciclina (HASH; WISHNICK; MILLER, 1964) e carbadox (MOSER; PEO JR.; LEWIS, 1980). Entretanto, Cromwell (1991) relatou que os níveis observados no metabolismo são muito pequenos para exercerem efeito significativo como promotor de crescimento. Além disso, os efeitos metabólicos certamente não explicam a ação dos antibióticos no intestino. Hathaway et al. (1996) postularam que o efeito de níveis subterapêuticos de agentes antimicrobianos agirem como promotores de crescimento se deve a um aumento na concentração de somatomedina C.

Micro-organismos presentes no lúmen intestinal produzem substâncias tóxicas como amônia. Estas irritam a parede intestinal, levando a um espessamento e morfologia da mesma (PARKER; ARMSTRONG, 1987). Estas alterações são representadas por aumento nas vilosidades e em uma maior relação vilosidade:cripta, que é indicativo de baixa taxa de migração de enterócitos. O peso do intestino dos animais livres de agentes patogênicos é menor do que os convencionais. Os autores sugeriram que a redução na produção de produtos tóxicos oriundos da atividade microbiana na digesta ou da atividade microbiana na microvilosidade poderiam reduzir lesões aos enterócitos e assim reduzir o *turnover* intestinal. Além disso, na ausência de agentes antimicrobianos, aproximadamente 10 e 25% do nitrogênio não proteico do intestino delgado e grosso consistia de amônia oriunda da desaminação de aminoácidos e da degradação da ureia (DIERICK et al., 1986a). Tanto a desaminação como a descarboxilação foram reduzidas ao fornecer virginamicina e espiamicina na dieta. Dierick et al. (1986a) consideraram que a formação de amônia e aminas foi importante tanto do ponto de vista nutricional como toxicológico. Ambos apresentaram efeitos deletérios no metabolismo de nutrientes e absorção no intestino delgado. Esta alteração tecidual (proteínas integrais de membrana), por consequência, reduz a absorção de nutrientes. A utilização de antibióticos resulta em redução de bactérias patogênicas, consequentemente, a

parede intestinal torna-se mais fina, pois reduz o crescimento da parede intestinal, reduz o *turnover* de enterócitos e reduz a umidade fecal, facilitando a absorção de nutriente (HENDERICKX; VERVAEKE, 1981; ANADÓN; LARRAÑAGA, 1999).

Dierick et al. (1986b) demonstraram que a presença de antibióticos aumentou a digestibilidade ileal aparente do nitrogênio (+2,1%), lisina (+1,4%), glicina (+4,8%), valina (+2,2%) e metionina (+3,3%). A virginamicina propiciou um aumento de 9% na absorção de aminoácidos livres. A ação benéfica destes aditivos ocorre mais sobre enzimas localizadas nas microvilosidades do que no citosol.

A redução da massa intestinal em animais recebendo antibióticos significa maior disponibilidade de energia e nutrientes (vitaminas, ácidos graxos, glicose e minerais) para outros tecidos, resultando em melhor desempenho produtivo (CROMWELL, 1991; ANADÓN; LARRAÑAGA, 1999).

3.2 Alimentos Funcionais

Apesar da comprovada capacidade de aumentar o desempenho de suínos e aves, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, vem sendo restringido. Desde 2006, a União Europeia não importa carne de animais tratados com antimicrobianos promotores de crescimento (COSTA; TSEM; MIYADA, 2007).

É fato notório e crescente a restrição, em todo mundo, ao uso de antibióticos em doses subterapêuticas como aditivos da nutrição animal devido à possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004).

A demanda por alimentos seguros e a restrição ao uso de antimicrobianos na ração animal, têm exigido maiores estudos sobre suplementos alimentares, que podem ser ingredientes de origem microbiana, nutricionalmente funcionais na prevenção de doenças. Sabe-se que a nutrição é uma das principais ferramentas para suprir as necessidades orgânicas dos animais e proporcionar desempenho e produtividade associados ao bom funcionamento do sistema de defesa contra agentes patogênicos (STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008).

Os aditivos alimentares são alternativas de substituição aos antibióticos, utilizados rotineiramente na dieta animal e que podem deixar resíduos na carne e nos derivados dos animais que os receberam na dieta, além de induzir o

crescimento de populações bacterianas resistentes, causando riscos significativos à saúde animal e humana (RUSSEL; HOULIHAN, 2003). Alguns aditivos são constituídos de ingredientes não digeríveis, que afetam de maneira benéfica o organismo, por estimularem seletivamente o crescimento e ou atividade de um ou um numero limitado de bactérias do cólon. São substâncias que modificam a composição da microbiota colônica de tal forma que as bactérias com potencial de promoção de saúde tornam-se a maioria predominante (CAPRILES; SILVA; FISBERG, 2005).

O papel da alimentação nutricionalmente equilibrada na manutenção da saúde e prevenção de doenças tem despertado interesse pela comunidade científica que produz estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças (PADILHA; PINHEIRO, 2004).

Estes alimentos, denominados de alimentos funcionais ou nutracêuticos, são definidos como aqueles que em virtude de componentes fisiologicamente ativos, promovem benefícios para a saúde (CARRARA et al., 2009).

O uso destes alimentos visa, igualmente aos promotores de crescimento, obter o máximo desempenho produtivo animal, com o diferencial de disponibilizar ao mercado um produto final saudável (ausência de resíduos de antimicrobianos), sem representar riscos à saúde do consumidor (SILVA; NÖRNBERG, 2003), além de serem vistos como promotores de saúde e também estarem associados à redução do risco de doenças crônico degenerativas e não transmissíveis (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005).

Entre esses alimentos, encontram-se os prebióticos (STEFE et al., 2008). Esse ingrediente auxilia na manutenção, equilíbrio e integridade da mucosa intestinal, promovendo o crescimento da microbiota benéfica e protegendo o organismo da microbiota patogênica (SILVA et al., 2012).

3.3 Prebióticos

Nos últimos anos, tem sido crescente o interesse pelo uso de prebióticos como alternativa aos tradicionais antimicrobianos, pois seu uso poderia eliminar problemas como resistência bacteriana e resíduos de antibióticos nos produtos de origem animal, além de melhorar a imagem desses produtos perante o mercado consumidor (ALBINO et al., 2006).

O desenvolvimento dos prebióticos veio da descoberta dos fatores bifidus, oligossacarídeos presentes apenas no leite humano, que favorecem a multiplicação de bifidobactérias de recém-nascidos amamentados ao seio (SANTOS et al., 2006).

Em geral, os prebióticos são oligossacarídeos não-digestíveis (ONDs) que chegam intactos no intestino grosso. Nesse local, serão fermentados pelas bactérias, mediante produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), entre outros compostos (DELZENNE, 2003).

Os prebióticos são ingredientes não digestíveis, não hidrolisáveis e nem absorvidos na porção superior do trato gastrointestinal e que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias desejáveis, resultando em melhor equilíbrio da microbiota intestinal, favorecendo os processos de digestão e absorção dos nutrientes pelo homem e pelos animais (ROY; GIBSON, 1998). Os principais prebióticos são a base de oligossacarídeos, podendo ser citados: mananoligossacarídeos (MOS), frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS), lactose e β -glucanos (BERTECHINI, 2006).

Dentre as características de um prebiótico temos: resistência às enzimas salivares, pancreáticas e intestinais, bem como ao ácido estomacal; não deve sofrer hidrólise enzimática ou absorção no intestino delgado; quando atingir o cólon deve ser metabolizado seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas; deve ser capaz de alterar a microbiota colônica para uma microbiota bacteriana saudável e ser capaz de induzir efeito fisiológico que seja importante para a saúde (SANTOS et al., 2006).

Segundo Roberfroid e Slavin (2000), a resistência à digestão no trato gastrintestinal superior e a fermentação no intestino grosso é um dos principais critérios para escolha dos oligossacarídeos como prebióticos.

Os prebióticos têm merecido especial atenção como uma alternativa ao uso dos tradicionais antibióticos (CONNOLLY, 2001) e são substâncias utilizadas nas dietas com a finalidade de modificar benéficamente as características químicas, físicas, microbiológicas e sensoriais e melhorarem o desempenho dos animais (BERTECHINI, 2006).

Segundo Silva e Nörnberg (2003), os prebióticos interferem nas características anatômicas do trato gastrointestinal, pois promovem o aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal, e no sistema imune e, em alguns casos, melhora o desempenho animal.

3.3.1 Mananoligossacarídeos (MOS)

O MOS é um dos prebióticos (oligossacarídeos) mais pesquisados e é derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A parede celular é separada do conteúdo intracelular e o líquido contendo o MOS é evaporado a baixa temperatura (*spray dry*) para evitar a destruição da parte funcional na molécula de MOS. A parede celular da levedura é formada por glucanos e mananos, em proporções similares e pode conter proteínas, enquanto a quitina está presente em pequena quantidade. A estrutura da parede celular da levedura é resistente à degradação das enzimas e bactérias do aparelho digestivo (SPRING et al., 2000).

O MOS age como protetor do mecanismo de defesa dos vertebrados em geral. Estudos demonstram que a manose, quando adicionada à dieta, reduz a colonização de bactérias patogênicas no organismo do animal (LIMA, 2008).

Sua ação se explica pela interferência com a aderência de bactérias Gram-negativas que utilizam lectinas, presentes nas fímbrias aderentes a manose (fenômeno de adsorção) (FERNANDES; MALAGUIDO; SILVA, 2003). Em vez de aderir aos receptores presentes nas células do trato gastrointestinal, as bactérias aderem aos receptores do MOS presentes no conteúdo intestinal e são eliminadas pelo peristaltismo. Atualmente, sabe-se que alguns mananoligossacarídeos possuem a capacidade de adsorver bactérias patogênicas ou oportunistas que residem no trato gastrointestinal, modificando sua constituição bacteriológica. Este processo de adsorção é observado entre bactérias portadoras de fímbrias do tipo I e o MOS, possivelmente devido a capacidade de ligação destas fímbrias a D-manose, constituinte do MOS (FIRON; OFEK; SHARON, 1982; SPRING et al., 2000).

Já foram descritas várias cepas de *E. coli* e *Salmonella* que possuem este tipo de fímbria e que, por sua vez, podem adsorver ao MOS (FINUCANE et al., 1999). Assim, a capacidade de prejudicar a aderência bacteriana pode representar uma estratégia para combater a infecção bacteriana devido a sua importância no início do processo infeccioso (CEGELSKI et al., 2008).

Os mananoligossacarídeos exercem efeito significativo de promoção de crescimento pelo aumento da resistência a patógenos entéricos, por melhorarem a disponibilidade da energia dietética, graças à redução da competição microbiota-hospedeiro por amido e açúcares e por diminuir o pH intestinal, que suprime a proliferação de bactérias putrefativas que excretam amônia como subprodutos da fermentação (FERKET, 2004). Além disso, os MOS modulam a motilidade gastrointestinal, reduzem a diarreia (absorção de água aumentada), promovem o desenvolvimento da mucosa do íleo e do cólon, proporcionam energia a mucosa intestinal, aumentam a proteção contra infecções (função de barreira, imunidade) entre outros (BORGES; NUNES, 2003).

Diversas evidências indicam que a adição de prebióticos de manose as dietas de animais pode estimular a função de defesa imunológica (DAWSON; PIRVULESCU, 1999). Estes compostos ligariam a sítios receptores dos macrófagos pelo reconhecimento de determinados açúcares, presentes nas glicoproteínas da superfície epitelial, desencadeando uma reação em cascata que resultaria na ativação dos macrófagos e liberação de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose e a indução na síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial a IgA (BRANDTZAEG, 1998; MACFARLANE; CUMMINGS, 1999).

O MOS atua benéficamente modulando a resposta imune dos animais através da apresentação de patógenos às placas de Payer. Os patógenos e as toxinas ligados ao MOS formam um grande novelo que é facilmente identificado pelo sistema imune. Estudos mostram uma maior produção de imunoglobulina A (IgA) sérica em cães e maior atividade neutrofílica (LAUE; TUCKER, 2006).

3.3.2 Mecanismos de ação

São relatadas três respostas distintas quanto ao uso de prebióticos na alimentação animal; a primeira refere-se à modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro; a segunda é a possível ação melhoradora sobre o sistema imune e sobre certos aspectos anatômicos do sistema digestório; e a terceira é a consequência direta dessas duas primeiras e demonstra a influência do uso destes compostos sobre o desempenho animal (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

O principal mecanismo de ação dos oligossacarídeos no intestino, em geral, se dá pela modificação do ecossistema bacteriano com aumento no número de *Lactobacillus* e das *Bifidobacterium* (SUN, 2004), que suprimem a atividade de bactérias putrefativas e reduzem a formação de produtos tóxicos da fermentação, tais como amônia, aminas e nitrosaminas (FLICKINGER; VAN LOO; FAHEY JR., 2003). Além disso, a fermentação no intestino grosso aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e reduz o pH da digesta. Essas ações são, provavelmente, responsáveis pela proliferação de bactérias benéficas (JUSKIEWICS; ZDUNCZYK; JANKOWSKI, 2004). O baixo pH reduz a habilidade de patógenos entéricos colonizar o intestino, pois o crescimento de organismo oportunistas, incluindo patógenos como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., é favorável pelo pH neutro, enquanto valores menores favorecem o crescimento de bactérias residentes, incluindo lactobacilos (MATHEW, 2001).

Para que as bactérias patogênicas consigam colonizar o trato gastrointestinal e criar uma condição patológica, precisam inicialmente aderir-se à superfície epitelial. Esta adesão ocorre por meio de glicoproteínas (lectinas ou fímbrias) que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, as bactérias se ligam a um oligossacarídeo dietético, e não à mucosa intestinal, o que faz com que estas sejam eliminadas, passando com a digesta sem causar problemas digestivos para os animais (COLLETT, 2000). Desta forma, os mananoligossacarídeos, prebióticos, são capazes de bloquear a aderência dos patógenos e evitar a colonização (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Estudos realizados por Kien et al. (2007) com leitões alimentados com rações líquidas em substituição ao leite da matriz, contendo ou não prebiótico (inulina), verificaram que os animais com a inulina apresentaram menores valores de pH no fluido luminal coletado no ceco em relação aos animais que receberam dieta sem a inclusão de prebióticos. Foi observado que o butirato produzido pela fermentação bacteriana de carboidratos normalmente ingeridos pelos leitões, pode desempenhar um papel importante no crescimento das vilosidades intestinais.

3.3.3 Melhora nos parâmetros zootécnicos

Os mananoligossacarídeos podem melhorar o desempenho produtivo (FRITTS; WALDROUP, 2003; HOOGE et al., 2003; JAMROZ et al., 2004; SIMS et

al., 2004) e o rendimento de carcaça (DEMIR; SEKEROGLU; SARICA, 2001) de aves, pelos seus efeitos positivos sobre a mucosa intestinal e sistema imune e por diminuir a colonização de bactérias patogênicas.

Santin et al. (2000), observaram diferenças significativas aos 21 e 42 dias de idade no desempenho de frangos de corte quando compararam dietas suplementadas com prebiótico e dietas não suplementadas, o que foi correlacionado com o aumento no tamanho de vilo da mucosa intestinal das aves suplementadas aos 7 dias de idade.

Parks et al. (2001), observaram que a utilização dos MOS em dieta para perus proporcionou uma melhora no ganho de peso e na conversão alimentar quando comparados com o grupo controle.

Rostagno et al. (2003), avaliando o efeito de prebiótico a base de mananoligossacarídeos em rações contendo milhos de diferentes qualidades nutricionais, verificaram melhoria no ganho de peso, na conversão alimentar e no fator de produção das aves tratadas com o prebiótico.

Em ensaios com juvenis de *Cyprinus carpio* (carpa) alimentados com ração contendo 0,6% de mananoligossacarídeo na dieta durante 46 dias resultou em acréscimo no crescimento, maior absorção de proteínas e aumento na taxa de sobrevivência, quando comparadas ao grupo controle (CULJAK et al., 2004).

Miguel, Rodriguez-Zas e Pettigrew (2004), ao analisar dados de 54 experimentos, verificaram aumentos de 4,12% no ganho de peso, 2,11% no consumo de ração e 2,29% na eficiência alimentar de leitões que receberam dietas contendo MOS como prebiótico. Castillo et al. (2008), ao utilizar 0,2% de MOS nas dietas iniciais de leitões, também observaram melhorias na eficiência alimentar dos animais que consumiram o prebiótico em relação àqueles que receberam dietas contendo zinco na forma orgânica e dieta controle (sem adição de promotor de crescimento).

Junqueira et al. (2009) verificaram que suínos alimentados a base de ração com prebiótico, no período de 42 a 104 dias de idade, apresentaram maior ganho de peso que aqueles alimentados com ração controle negativo e com antibiótico.

Silva (2010), observaram que frangos submetidos a estresse térmico suprimiu significativamente o desempenho dos animais, enquanto que, adicionado mananoligossacarídeo, pode levar a um aumento no ganho de peso corporal e

diminuição na conversão alimentar. Os prebióticos aumentam o apetite e o consumo de ração em frangos de corte, o que, eventualmente, leva a um aumento no ganho de peso corporal e na eficiência alimentar (GAO et al., 2008).

3.3.4 Modificações anatômicas do trato gastrointestinal

Os prebióticos podem causar modificações benéficas nas características anatômicas do trato gastrointestinal, promovendo o aumento na área de absorção da mucosa intestinal. Os MOS tem sido associados à manutenção da integridade da mucosa intestinal, por aumentarem a altura dos vilos de frangos (IJI; SAKI; TIVEY, 2001) em diferentes partes do intestino delgado.

Howard et al. (1993) observaram aumento na densidade celular (número de células/crípta) e no número de células marcadas com 5-bromo-2-deoxipridina (número/crípta) da mucosa cecal de leitões que receberam adição de FOS em suas dietas. Neste tratamento, também foram observados maior comprimento das criptas, maior zona de proliferação (células marcadas/densidade celular), maior número e comprimento de células marcadas das partes proximal e distal do cólon, quando comparado ao controle

Loddi (2003) utilizou 0,1% de MOS em dietas para frangos e relatou que nessas aves os vilos eram mais altos e com maior perímetro, comparados com aves que consumiram dietas sem aditivos.

Pesquisadores observaram que a adição de MOS em dietas para frangos de corte de 7 dias de idade levou a uma melhora no desenvolvimento das vilosidades intestinais, com aumento significativo da altura do vilo nos três segmentos do intestino delgado (MACARI; MAIORKA, 2000; MACARI; FURLAN, 2005).

Estudo realizado com larvas de bijupirá (*Rachycentron canadum*) alimentados com dietas suplementadas com 0,2% de MOS apresentaram vilos intestinais mais desenvolvidos (2,04 μm) quando comparados as que não receberam ração suplementada (1,18 μm) (SALZE et al., 2008).

Oliveira et al. (2009), observaram que a adição de mananoligossacarídeos ou complexo enzimático as dietas de frangos, melhorou o perímetro e a altura das vilosidades intestinais, porem o efeito dos dois aditivos não foi suficiente para melhorar o desempenho das aves.

3.3.5 Efeitos imunoestimulatórios

Efeitos benéficos da utilização dos prebióticos na nutrição animal têm sido relatados. Pesquisadores observaram que a adição de prebióticos resultou em aumento nos níveis séricos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) (HUANG et al., 2007) e também um aumento da resposta macrofágica em diferentes espécies animais (YANG; IJI; CHOCT, 2009).

Estudo utilizando ácidos orgânicos, prebiótico e probiótico, adicionados na dieta de frangos de corte, para avaliação da resposta imune demonstrou que a utilização de ácidos orgânicos e prebióticos resultaram em um aumento significativo nos títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle quando comparados com o grupo controle, com animais de 21 dias de idade vacinados. Porém, não foi encontrada diferença significativa entre os animais tratados com probióticos e o grupo controle. Aos 42 dias de idade, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (HOUSHMAND et al., 2012).

Em estudos conduzidos por Kim et al. (2011), estes pesquisadores utilizaram dois prebióticos, os frutoligossacarídeos (FOS) e os mananoligossacarídeos (MOS), em quatro tratamentos com diferentes dosagens (FOS 0,25%; FOS 0,5%; MOS 0,025%; MOS 0,05%) e um antibiótico para avaliar o efeito destes sobre os parâmetros sanguíneos e imunoglobulinas séricas de frangos de corte assim como a microbiota intestinal. Os resultados demonstraram que a relação heterófilo:linfócito e os leucócitos basófilos foram maiores nos grupos controle e no grupo FOS 0,5 quando comparados com os outros grupos tratados. Os autores não conseguiram explicar essa diferença decorrente de terem poucos estudos nessa área. As concentrações plasmáticas de imunoglobulinas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, discordando dos resultados encontrados por Yin et al. (2008), que verificaram que a suplementação com prebiótico resultou em um aumento nos níveis séricos de IgA, IgG e IgM.

Em relação à população microbiana, esses pesquisadores observaram que nos grupos tratados com FOS 0,25% e MOS 0,05%, a população de *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* foram diminuídas e a população de *Lactobacillus* e bactérias totais foram aumentadas, afirmando o efeito dos prebióticos em estimularem o desenvolvimento de bactérias benéficas e reduzir a atividade de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal.

Além disso, estes mesmos autores relataram que no grupo tratado com FOS 0,25% os resultados foram superiores quando comparados com o grupo FOS 0,5% por este possuir um nível de adição excessivo.

Confrontando com os resultados obtidos nos dois trabalhos citados acima, Gürbüz et al. (2010) avaliaram a suplementação de frutoligossacarídeo (FOS) e mananoligossacarídeo (MOS) sobre a função imune em cavalos adultos. Esses pesquisadores não encontraram resultados satisfatórios sobre as concentrações séricas de IgA, IgG e IgM nos cavalos suplementados com os dois prebióticos. Os autores acreditam que esses resultados são devidos aos animais já serem adultos e também por não apresentarem nenhum tipo de estresse, afirmando que o uso dos prebióticos podem apresentar resultados benéficos em cavalos jovens ou em cavalos submetidos a estresse.

Bassan et al. (2008) avaliaram a ação de dois ácidos orgânicos (fórmico e propiônico) e de um prebiótico (mananoligossacarídeo), adicionados a dieta de frangos de corte, no controle da infecção intestinal por *Salmonella enteritidis*. Os autores observaram resultados satisfatórios nos grupos tratados com ácidos orgânicos e ácidos orgânicos mais prebiótico, sendo que nesse último grupo, o número de aves infectadas foi menor no 25º do tratamento, indicando a maior capacidade dos mananoligossacarídeos em inibirem a colonização de patógenos por meio do bloqueio das fímbrias do tipo 1, que permitem que esse patógenos ataquem a superfície epitelial do intestino.

No 32º dia de tratamento, 100% das aves apresentaram resultados negativos para *Salmonella enteritidis* nos tratamentos com adição de ácidos e prebiótico, justificando a importância da utilização desses elementos no controle da infecção por esse patógeno.

3.3.6 Diminuição do risco de câncer de cólon

Os prebióticos são positivamente associados na prevenção do câncer de cólon através da modulação da microbiota do cólon (LIM et al., 2005).

Estudos com ratos mostraram que a administração de prebióticos na dieta suprimiu significativamente o número de focos de criptas aberrantes no cólon, quando comparado à dieta controle. Criptas aberrantes são lesões precursoras putrefativas, a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver no

cólon. Essa inibição era mais pronunciada em ratos alimentados com inulina do que aqueles que recebiam oligofrutose. O papel desempenhado pela inulina e a oligofrutose na redução da formação das criptas aberrantes, um marcador pré-neoplásico precoce do potencial maligno no processo de carcinogênese do cólon, sugere que eles possuem potencial para suprimir a carcinogênese no cólon. Essa prevenção, provavelmente ocorre pela modificação da microbiota do cólon. Entretanto, não há evidências em humanos de que os prebióticos sejam capazes de prevenir a iniciação do câncer de cólon (SAAD, 2006).

Dessa forma, o presente trabalho avaliará três diferentes prebióticos a base de mananoligossacarídeos:

- MOS 1, mananoligossacarídeo, é um derivado da parede celular da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, cepa 1026, e que oferece receptores ricos em manose, que atraem as bactérias patogênicas, ocupando o sítio de ligação do patógeno e evitando que as bactérias se liguem a manose do epitélio intestinal e provoquem doenças nos animais, além disso, melhora o desempenho dos animais, por servir de substrato para bactérias benéficas presente na microbiota intestinal, aumentando assim, a digestão e absorção de nutrientes (COLLET, 2000).

- MOS 2, é uma fração ativa da mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo. Essa fração da mananoproteína atua sobre as bactérias patogênicas, sendo que a estrutura da levedura que atua sobre as bactérias patogênicas é a fração alfa 1,3 e alfa 1,6 mananoproteína (ALLTECH, 2010).

- MOS 3, é um aditivo prebiótico rico em β glucanos e mananoligossacarídeos, derivado de uma cepa especialmente selecionada de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Apresenta capacidade de aglutinar bactérias patogênicas permitindo uma melhoria no desempenho zootécnico dos animais de produção (ICC, 2010).

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. Effect of probiotics on broilers performance. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 5, n. 6, p. 593-597, 2006. doi: 10.3923/ijps.2006.593.597
- ALBINO, L. F. T. et al. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **R. Bras. Zootec.**, v. 35, n. 3, p. 742-749, 2006. doi:10.1590/S1516-35982006000300015.
- ALLTECH. **Nutrição, saúde, desempenho...naturalmente**. 2010. Disponível em: <<http://www.alltech.com/pt/about/story/Pages/default.aspx>> Acesso em: 09 de Setembro de 2011.
- ANADÓN, A.; LARRAÑAGA, M. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONOMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL. **Anais...** Campinas: CBNA, 1999. p. 105-128.
- ASAHARA, T. et al. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2240–2247, 2004. doi:10.1128/IAI.72.4.2240-2247.
- BASSAN, J. D. L. et al. Controle da infecção por *Salmonella enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1961-1965, out, 2008. doi:10.1590/S0103-84782008000700025
- BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras, MG: UFLA, 2006.
- BEST, P. Europa confirma la prohibicion de antibióticos. **Industria Porcina**, v. 19, n. 2, p. 5-6, 1999.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v. 35, n. 2/3, p. 125-131, 2002. doi:10.1016/S0963-9969(01)00173-9.
- BORGES, F. M. O.; NUNES, I. J. Dietas específicas para pacientes especiais. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO DE PETS. **Anais...** [Belo Horizonte]: UFMG, Escola de Veterinária, 2003.
- BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 1, p. 5-18, 1998. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01645.x
- CAPRILES, V. D.; SILVA, K. E.; FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Nutr. Bras.**, v. 6, p. 27-333, 2005.
- CARRARA, C. L. et al. Uso da semente de linhaça como nutracêutico para prevenção e tratamento de arterosclerose. **Rev. Eletr. Farmácia**, v. 4, p. 1-9, 2009.

CASTILLO, M. et al. Use of mannan-oligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function. **J. Anim. Sci.**, v. 86, p. 94-101, 2008. doi: 10.2527/jas.2005-686.

CEGELSKI, L. et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 1, p. 17-27, 2008. doi:10.1038/nrmicro1818.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 82, n. 2, p. 133-141, 2003. doi:10.1016/S0168-1605(02)00248-9.

COLLETT, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: RONDA LATINO-AMERICANA: O FUTURO DA ALIMENTAÇÃO, 10., 2000, Brasil. **Palestras...** Brasil: Alltech, 2000. p.20-30.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs**, 2003. Disponível em: <http://register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06/st06120en03.pdf>. Acesso em: 30 maio 2012.

CONNOLLY, A. Reagindo ao desafio da retirada dos antibióticos promotoras de crescimento das rações e a forma como os oligossacarídeos específicos assumiram a dianteira. **Feed Compounder**, p.20-25, junho/julho, 2001.

COSTA, L. B.; TSEM, L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 3, p. 116-123, 2007. doi:10.1590/S1516-35982007000300011.

CROMWELL, G. L. Antimicrobial agents. In: MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; LEWIS, A. J. (Ed.). **Swine nutrition**. Boston, M.A: Butterworth-Heinemann, 1991.

CROMWELL, G. L. Why and how antibiotics are used in swine production. **Anim. Biotechnol.**, v. 13, p. 7-27, 2002. doi:10.1081/ABIO-120005767.

CULJAK, V. et al. Influence of mananoligosaccharides supplementation on juvenile carp (*Cyprinus carpio*) in cage farming. **Krmiva**, v. 46, n. 1, p. 25-29, 2004.

DAWSON, K. A.; PIRVULESCU, M. Mananoligossacarídeos derivados de leveduras como moduladores da resposta imunológica e alternativas aos promotores de crescimento antimicrobianos. In: RONDA LATINO-AMERICANA DA ALLTECH, 9., 1999, Curitiba. **Anais...** p. 33-41, 1999.

DELZENNE, N. M. Oligosaccharides: state of the art. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 62, n. 1, p. 177-182, 2003. doi:10.1079/PNS2002225.

DEMIR, E.; SEKEROGLU, A.; SARICA, S. Comparison of the effects of flavomycin, mannanoligosaccharide and probiotic addition to broiler diets. **Br. Poult. Sci.**, v. 42, Suppl. 1, p. S89-S90, 2001.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult. Sci.**, v. 84, n. 4, p. 634, 2005.

DIERICK, N. A. et al. Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. II: studies in vivo. **Livest. Prod. Sci.**, v. 14, n. 2, p. 177-193, mar. 1986a.

DIERICK, N. A. et al. Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. I: studies in vitro. **Livest. Prod. Sci.**, v.14, n. 2, p. 161-176, mar. 1986b.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Rev. Bras. Ciênc. Avic.**, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003. doi:10.1590/S1516-635X2003000200001.

FERKET, P. R. Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. In: INTERNATIONAL FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 20., 2004, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2004. p. 54-67.

FERNANDES, P. C. C.; MALAGUIDO, A.; SILVA, A. V. Manejo nutricional visando substituir a utilização de antimicrobianos em alimentos para aves. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS CBNA, 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: CBNA. p.135-166, 2003.

FINUCANE, M. C. et al. Incidence os mannose sensitive od adhesins in enteric bactéria. **Annual Meeting Poultry Science Association**, 88., 1999. p.139. Abstract.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 105, p. 1426-1432, 1982. doi:10.1016/0006-291X(82)90947-0.

FLICKINGER, J. S.; VAN LOO, J.; FAHEY JR., G. C. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 43, n. 1, p. 19-60, 2003. doi:10.1080/10408690390826446.

FRITTS, C. A.; WALDROUP, P. W. Evaluation of Bio-Mos® mannan oligosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diets for turkeys. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 19-22, 2003. doi: 10.3923/ijps.2003.19.22.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004. **Anais...** Balneário Camburiú, SC: [S.n.], 2004. p. 23.

GAO, J. et al. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. **Poult. Sci.**, v. 87, p. 1377–1384, 2008. doi:10.3382/ps.2007-00418.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, B. M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 95, p. S2-S4, 2000.

GÜRBÜZ, E. et al. Effects of supplemental fructo-oligosaccharide and mannan-oligosaccharide on nutrient digestibilities, volatile fatty acid concentrations, and immune function in horses. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 34, n. 1, p. 39-44, 2010. doi:10.3906/vet-0802-33.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 18, n. 5, p. 613-622, set./out. 2005. doi:10.1590/S1415-52732005000500004.

HASH, J. H.; WISHNICK, M.; MILLER, P. A. On the mode of action of the tetracycline antibiotics in *staphylococcus aureus*. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 2070–2078, jun. 1964.

HATHAWAY, M. R. et al. Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations are increased in pigs fed antimicrobials. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 1541-1547, 1996.

HENDERICKX, H. K.; VERVAEKE, I. J. In: PROCEEDINGS OF THE GROWTH PROMOTION MODE-OF-ACTION SYMPOSIUM. Philadelphia: Smithkline, 1981. p. 3-9.

HOOGE, D. M. et al. Effect of dietary mannan oligosaccharide, with or without bacitracin or virginiamycin, on live performance of broiler chickens at relatively high stocking density on new litter. **J. Appl. Poultry Res.**, v. 12, n. 4, p. 431-467, 2003.

HOUSHMAND, M. et al. Effects of non-antibiotic feed additives on performance, immunity and intestinal morphology of broilers fed different levels of protein. **S. Afr. J. Anim. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 22-32, 2012. doi:10.4314/sajas.v42i1.3.

HOWARD, M. D. et al. Effect of dietary addition of fructooligosaccharide on colonic microflora populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 71, supp. 1, p. 177, 1993.

HUANG, R. L. et al. Dietary oligochitosan supplementation enhances immune status of broilers. **J. Aci. Food Agric.**, v. 87, p. 153-159, 2007. doi: 10.1002/jsfa.2694.

ICC. **Immunowall**. 2010. Disponível em: <http://www.yeastbrazil.com/Site/Produto.aspx?ID=5>. Acesso em: 11 jun. 2012.

IJI, P. A.; SAKI, A. A.; TIVEY, D. R. Intestinal development and body growth of broiler chicks on diets supplemented with non-starch polysaccharides. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 89, n. 1, p. 175-188, 2001. doi:10.1016/s0377-8401(00)00223-6.

JAMROZ, D. et al. Response of broiler chickens to the diets supplemented with feeding antibiotic or mannanoligosaccharides. **EJPAU**, v. 7, n. 2, 2004.

JUNQUEIRA, O. M. et al. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, n. 12, p. 2394-2400, 2009. doi:10.1590/S1516-35982009001200015.

JUSKIEWICS, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANKOWSKI, J. Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. **World Poultry Sci. J.**, v. 60, n. 2, p. 177-185, 2004. doi:10.1079/WPS200311.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci.**, Bangalore, v. 27, p. 703-714, 2002.

KIEN, C. L. et al. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation on piglets. **J. Nutr.**, v. 137, n. 4, p. 916-922, 2007.

KIM, G. B. et al. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance intestinal microflora, and immune responses of broilers. **Poult. Sci.**, v. 90, p. 75-82, 2011. doi: 10.3382/ps.2010-00732.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. **Anais Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas, Brasil, p. 21-33, 2005.

LAUE, D.; TUCKER, L. A. **Recent Advances in Pet Nutrition**. United Kingdom: Nottingham University Press, 2006.

LIM, C. C.; FERGUSON, L. R.; TANNOCK, G. W. Dietary fibres as “prebiotics”: implications for colorectal cancer. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 49, n. 6, p. 609–619, 2005. doi: 10.1002/mnfr.200500015.

LIMA, H. J. D. Prebiótico na dieta de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 4, p. 599-606, 2008.

LODDI, M. M. **Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico em dietas para frango de corte**. 2003. 52 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MACARI, M.; FURLAN, R. L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1., 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2005. p.53-71.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p 161-174.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal benefit health? **BMJ**, v. 18, p. 999-1003, 1999.

MATEOS, G. G.; GONZÁLES-ALVARADO, J. M.; LÁZARO, R. Facing the realities of poultry health and performance without antibiotics in Europe. In: INTERNATIONAL FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 20., 2004, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2004. p. 69-79.

MATHEW, A. G. et al. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v. 71, n. 6, p. 1503-1509, 1993.

MATHEW, A. G. Nutritional influence on gut microbiology and enteric diseases. In: INTERNATIONAL FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 17., 2001, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Alltech, 2001, p.49-64.

MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p.141-157.

MENTEN, J. F. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2002. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2002. p. 251-276.

MIGUEL, J. C.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; PETTIGREW, J. E. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. **Swine Health Prod.**, v. 12, n. 6, p. 296-307, 2004.

MILTENBURG, G. Promotores e Aditivos de Crescimento em Avicultura: Estado da Arte.... In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 de CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. v.2, p.205-215.

MOSER, B. D.; PEO JR., E. R.; LEWIS, A. J. Effect of carbadox on protein utilization in the baby pig. **Nutr. Rep. Int.**, v. 22, n. 6, p. 949-956, 1980.

OLIVEIRA, M. C. et al. Dietas com mananoligossacarídeos e níveis reduzidos de cálcio para codornas japonesas. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, n. 11, p. 2193-2197, 2009. doi: 10.1590/S1516-35982009001100018.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v.3, n.50, p.251-260, 2004.

PALERMO, J. N. Uso de medicamentos veterinários: Impactos na moderna avicultura. **Anais do Simpósio Brasil Sul de Avicultura**, Chapecó, Brasil, p. 70-78, 2006.

PARKER, D. S.; ARMSTRONG, D. G. Antibiotic feed additives and livestock production. **P. Nutr. Soc.**, v.4 6, n. 3, p. 415-421, set. 1987. doi: <http://dx.doi.org/10.1079/PNS19870056>.

PARKS, C. W. et al. The effect of mannanoligosaccharides, bambarmycin and virginiamycin on performance of large white male market turkeys. **Poult. Sci.**, v. 80, n. 6, p. 718-723, 2001.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A. Utilização de probiótico e/ou prebiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frango de corte. **Rev. Bras. Ciênc. Avi.**, supl. 6, p. 17, 2003.

PHILLIPS, G. O.; OGASAWATA, T.; USHIDA, K. The regulation and scientific approach to defining gum arabic (*Acacia Senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fiber. **Food Hydrocolloid.**, v. 22, n. 1, p. 24-35, 2008. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.12.016.

ROBERFROID, M. B.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 40, n. 60, p. 461-480, 2000. doi:10.1080/10408690091189239.

ROSTAGNO, H. S. et al. Avaliação de prebióticos à base de mananoligosacarídeos em rações de frangos de corte, contendo milhos de diferentes qualidades nutricionais. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS. **Anais...** Campinas: Apinco, 2003. supl. 5, p.52.

ROY, M.; GIBSON, G. R. Probiotics and prebiotics: microbial in menu. **C-H-O Carbohydrates**, v. 9, n. 3, p. 6, 1999.

RUSSEL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 27, p. 65-74, 2003. doi:10.1016/S0168-6445(03)00019-6.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 42, n. 1, p. 53-69, jan./mar. 2006. doi:10.1590/S1516-93322006000100002.

SADER, H. S. O uso de antimicrobianos promotores de crescimento contribui para a resistência a antibióticos? **Anais Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas, p. 211-217, 2004.

SALZE, G. et al. Novel live feed enrichments beneficially impact digestive ontogeny in larval cobia *Rachycentron candadum*. **Aquaculture America**, n. 8, p. 337, 2008. Abstract.

SANTIN, E. et al. Efeito de diferentes níveis de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho e mucosa intestinal de frangos. **Rev. Bras. Ciênc. Avi.**, v. 2, supl., p. 37, 2000.

SANTOS, E. F. et al. Alimentos funcionais. **Revista de Pesquisas Biológicas da UNIFEV**, São Paulo, n. 1, p. 13-19, jan./jun. 2006.

SILVA, J. D. T. et al. Simbiótico e extratos naturais na dieta de codornas japonesas na fase de postura. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 13, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2012. doi: 10.5216/cab.v13i1.5547.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Ciênc. Rural**, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003. doi:10.1590/S0103-84782003000500029.

SILVA, V. K. J. Yeast extract and prebiotic in pre-initial phase diet for broiler chickens raised under different temperatures. **R. Bras. Zootec.**, v. 39, p. 165–174, 2010. doi:10.1590/S1516-35982010000100022.

SIMS, M. D. et al. Effects of dietary mannan oligosaccharide, bacitracin methylene disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys. **Poult. Sci.**, v. 83, n. 7, p. 1148-1154, 2004.

SPRING, P. et al. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poult. Sci.**, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. **Saúde & Amb. Rev.**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, jan./jun. 2008.

SUN, X. **Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. Blacks-burg**. 2004. 59 f. Dissertation (Master of Science in Animal and Poultry Sciences) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, 2004.

YANG, Y.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, p. 97-114, 2009. doi:10.1017/S0043933909000008.

YIN, Y.L. et al. Effect of galacto-mannan-oligosaccharides or chitosan supplementation on cytoimmunity and humoral immunity in early-weaned piglets. Asian-australas. **J. Anim. Sci.**, v. 21, p. 723-731, 2008.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito de mananoligossacarídeos sobre parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos Wistar

(Effect of mannan-oligosaccharides on zootechnical and duodenal histomorphometric parameters in Wistar rats)

G.Z. SAKITA^{1*}; T.R. ALBUQUERQUE²; P.E. PARDO³; O.C. SANCHES⁴; H. BREMER-NETO³

1 Discente do Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente-SP.

2 Discente do curso de Medicina Veterinária – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente-SP.

3 Docentes do Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente-SP.

4 Docente do curso de Medicina Veterinária – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente-SP.

^{1*} Mestrado em Ciência Animal, Departamento de Ciências Funcionais, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. Fone: +55-18-3229-1181, E-mail: gabrielsakita@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a ação três prebióticos, mananoligossacarídeo (MOS), sobre parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos Wistar. Um total de 40 ratos machos foram utilizados por um período de 56 dias e distribuídos em um delineamento em blocos casualizados com quatro grupos [Grupo Controle (GC), Grupo MOS 1 (GM1), Grupo MOS 2 (GM2) e Grupo MOS 3 (GM3)]. O consumo acumulado de ração apresentou um aumento linear significativamente maior no grupo GM2 ($P < 0,05$), quando comparado com os grupos GC e GM3 e não diferiu do GM1, que diferiu significativamente do grupo GM3 e este não diferiu do grupo GC. O GM3 apresentou um aumento linear no percentual de ganho de peso e melhor conversão alimentar e diferiu dos demais grupos e estes quando comparados entre si, não diferiram. Os grupos de animais suplementados com MOS, apresentaram uma melhor eficiência alimentar, quando comparados com o grupo GC e não diferiram entre si. O GM3 apresentou maior altura de vilo e diferiu estatisticamente apenas do grupo GC. Os grupos GM1, GC e GM2 não diferiram estatisticamente entre si. No parâmetro área de vilo, o grupo GM3 diferiu do grupo GC e os grupos GC, GM1 e GM2 não diferiram entre si. Os resultados dos tratamentos não diferiram entre si no parâmetro profundidade de cripta e no número de células caliciformes. Os resultados do presente estudo sugerem que a utilização de diferentes prebióticos em dietas de ratos Wistar, podem apresentar efeitos benéficos nos parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais. Estes benefícios foram mais significativos no grupo de animais alimentados com dieta contendo MOS 3. As distintas respostas dos prebióticos nos parâmetros estudados no rato, podem estar ligados as diferentes cepas ou fragmentos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: prebióticos, levedura, desempenho animal, vilosidade intestinal

ABSTRAT

The present study was conducted to evaluate the action of three prebiotics, mannan-oligosaccharides (MOS), on zootechnical and duodenal histomorphometric parameters in Wistar rats. A total of 40 male rats were used for a period of 56 days and distributed in a randomized block design with four groups [control group (CG), MOS 1 Group (GM1), MOS 2 Group (GM2) and MOS 3 Group (GM3)]. The cumulative feed intake showed a significantly greater linear increase in GM2 ($P<0.05$) when compared with the CG and GM3 groups and did not differ from GM1, which differed significantly from GM3 group and this group did not differ from the control group. The GM3 showed a linear increase in the percentage of weight gain and better feed conversion and differed from the others and these groups when compared, did not differ. The groups of animals supplemented with MOS showed a better feed efficiency when compared with the control group. The GM3 showed higher villus height and statistically differed only in the CG group. The GM1, GM2 and GC groups did not differ statistically. In the villus area parameter, the GM3 group differed from the control group and the GC, GM1 and GM2 groups did not differ between them. The results of the treatments did not differ in crypt depth and the number of goblet cells. The results of this study suggest that the use of different prebiotics in the diet of rats may provide beneficial effects on the zootechnical and duodenal histomorphometric parameters. These benefits were more significant in the group of animals fed a diet containing MOS 3. Distinct responses of prebiotics in the parameters studied in rats, can be connected to different strains or fragments of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: prebiotics, yeast, animal performance, intestinal villus

Introdução

Nos últimos anos, existe um interesse considerável na utilização de prebióticos, como alimentos funcionais, a fim de modular a composição da microbiota do cólon para fornecer benefícios à saúde do hospedeiro (Coppa et al., 2006; Guarner, 2007; Vardakou et al., 2008; Silk et al., 2009).

Os prebióticos são compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados pelos micro-organismos do trato gastrintestinal e que podem estar presentes nos ingredientes da

dieta ou adicionados a ela por fontes exógenas (Gibson e Roberfroid, 1995). Além disso, promovem o aumento da população de bactérias úteis, como lactobacilos e bifidobactérias, que competem com patógenos para a produção de ácidos graxos voláteis, diminuem o pH intestinal, produzem compostos antimicrobianos, melhoram o sistema imunológico e melhoram os índices morfométricos intestinais (Fuller, 1989; Gibson e Roberfroid, 1995; Iji et al., 2001; Sandikci et al., 2004; Markovic et al., 2009).

Dentre os prebióticos, os mananoligossacarídeos (MOS), são substâncias complexas derivadas principalmente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Spring et al., 2000; Hooge, 2004; Kogan e Kocher, 2007) e quando incluídos na dieta, apresentam a capacidade de se aderir as bactérias patogênicas portadoras de fímbrias tipo 1, conseqüentemente, removendo-as do trato digestório através das fezes (Falcão-e-Cunha et al., 2007). Além disso, o MOS leva a um aumento na altura, uniformidade e integridade das vilosidades intestinais, aumenta a resposta imune e como resultado, melhora o desempenho e a saúde do animal (Ferket et al., 2004; Hooge, 2004; Ghosh et al., 2007; Kogan e Kocher, 2007; Rehman et al., 2009).

Há muitos relatos que mostram o benefício do MOS sobre o desempenho de várias espécies, como ganho de peso em bezerros (Hooge, 2006), ganho de peso e conversão alimentar de frangos (Parks et al., 2001; Hooge, 2003; Sims et al., 2004; Hooge, 2009), desempenho de coelhos (Mourão et al., 2006) e crescimento de suínos (Castillo et al., 2008).

Vários autores também citam alterações histomorfométricas, como vilosidades significativamente mais compridas no íleo em coelhos (Mourão et al.,

2006) e relação altura de vilosidade:profundidade de cripta maior em suínos (Castillo et al., 2008)

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de três prebióticos comerciais, mananoligossacarídeos, sobre os parâmetros zootécnicos (consumo acumulado de ração, percentual de ganho de peso, índice de conversão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar) e histomorfométricos duodenais (altura e área dos vilos, profundidade de cripta e quantificação de células caliciformes por vilo) de ratos Wistar.

Materiais e métodos

Design experimental

Para a realização desse estudo, foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 23 dias e $46,17 \text{ g} \pm 4,99 \text{ g}$ de peso corporal, provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente/SP.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade do Oeste Paulista, protocolos 1173/2012 e 1178/2012.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob as mesmas condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com temperatura em torno de 23°C (Merusse e Lapichik, 1996) e as dietas sólidas e hídricas foram fornecidas *ad libitum* durante o período experimental. O experimento

teve duração 56 dias, sendo os animais distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com dez animais.

O grupo controle (GC) consistiu de animais alimentados com ração basal (Supralab Especial, Alisul Ind. Alimentos Ltda., RS) (Tabela 1); grupo MOS 1 (GM1), alimentou-se ração basal acrescida de 1g do produto MOS 1 (mananoligossacarídeo, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 1026) por kg da dieta; para o grupo MOS 2 (GM2) foi utilizado a ração balanceada adicionada de 0,4g do produto MOS 2 (fração ativa, α -1,3 e α -1,6 mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo) por kg da dieta; e o grupo MOS 3 (GM3) utilizou-se a ração balanceada incorporada com 1g do produto MOS 3 (aditivo prebiótico rico em β -glucanos e mananoligossacarídeos, derivado de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*) por kg da dieta. As dosagens utilizadas seguiram recomendações dos fabricantes.

Tabela 1. Composição bromatológica da ração padrão para roedores.

Nutrientes	Níveis de garantia
Umidade	120 g.kg ⁻¹
Proteína bruta (min)	220 g.kg ⁻¹
Extrato etéreo (min)	25 g.kg ⁻¹
Matéria fibrosa (max)	60 g.kg ⁻¹

Matéria mineral (max)	100 g.kg ⁻¹
Cálcio (max)	12 g.kg ⁻¹
Cálcio (min)	8.000 mg.kg ⁻¹
Fósforo (min)	7.000 mg.kg ⁻¹

*Supralab Especial com premix mineral vitamínico: Composição por kg: metionina (mín) = 3000 mg; vit. A (mín) = 7000UI; vit. D3 (mín) = 2000UI; vit. E (mín) = 15UI; vit. K3 (mín) = 1 mg; vit. B1 (mín) = 2 mg; vit. B2 (mín) = 6 mg; vit. B6 (mín) = 3 mg; vit. B12 (mín) = 9 mcg; ácido fólico (mín) = 1 mg; ácido pantotênico (mín) = 12 mg; biotina(mín) = 0,5 mg; colina (mín) = 500 mg; niacina (mín) = 20 mg; Cu (mín) = 9 mg; Fe (mín) = 40 mg; Mg (mín) = 90 mg; Zn (mín) = 50 mg; I (mín) = 0,7 mg; e Se (mín) = 0,4 mg.

Parâmetros zootécnicos

Para realizar os ensaios de desempenho animal, os ratos foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente aleatorizado com quatro tratamentos (GC, GM1, GM2 e GM3). As pesagens foram realizadas no início do experimento e a cada sete dias para determinar o percentual de ganho de peso em relação ao peso inicial dos animais e também para determinar o coeficiente de eficiência alimentar (CEA = ganho de peso por grupo/consumo total de ração por grupo). Foi mensurado o consumo acumulado de ração pela pesagem da ração oferecida e posteriormente das sobras, sendo determinada pela diferença entre o peso inicial da ração e o peso das sobras (Kaminski et al., 2008). O índice de conversão alimentar foi calculado dividindo o consumo total da dieta por grupo pelo ganho de peso total por grupo.

Histomorfometria intestinal

Para determinar a histomorfometria intestinal, foi realizada a colheita do intestino delgado. Dessa forma, no final do período experimental, dez animais de cada grupo experimental foram anestesiados com Tiopental 50 mg.mL⁻¹ (Thiopentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – São Paulo/SP), com uma dosagem de 30 mg.Kg⁻¹ de peso vivo, por via intraperitoneal e eutanasiados por exsanguinação, conforme Paiva et al. (2005).

Imediatamente após ser constada a morte do animal, foram colhidas amostras do segmento inicial do intestino delgado (duodeno), sendo estas fixadas em solução de Davidson, por 24 horas, e depois lavadas em água corrente por uma hora, posteriormente, transferidas para uma solução de álcool 70%. Todas as etapas citadas acima foram realizadas no Biotério Experimental II da Universidade do Oeste Paulista.

Em seguida, as amostras foram processadas conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina, realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista. Com o auxílio do micrótomo rotativo, foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 5 µm de espessura de todas as amostras. Os cortes foram corados pelos métodos da hematoxilina e eosina (HE) e pela técnica histoquímica do ácido periódico de Schiff (P.A.S. - Periodic acid-Schiff) (Tolosa et al, 2003).

Foi confeccionada uma lâmina por animal de cada tratamento e, em cada, foram mensurados os comprimentos de dez vilos (Guillaumon e Couto, 2013) e profundidades de dez criptas (Clarke, 1977) que se apresentaram sem rupturas, e as áreas de dez vilos, totalizando a leitura de 100 vilos e 100 criptas por tratamento. Para quantificação das células caliciformes, foram tomadas dez vilos íntegros por

animal (Chen et al., 2009), totalizando a contagem de células em 100 vilosidades por tratamento.

A captura das imagens ocorreu no Laboratório de Biofísica da Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP, utilizando um Microscópio Óptico Leica DM 750, com câmera Leica ICC50 HD. Para mensuração da altura das vilosidades e profundidade das criptas, em micrômetros (μm), área das vilosidades, em micrômetros quadrados (μm^2) e contagem das células caliciformes, em aumento de 10x, utilizou-se o software Micrometrics® SE Premium.

Análises estatísticas

Parâmetros zootécnicos

O efeito dos produtos sobre o consumo acumulado de ração, conversão alimentar, eficiência alimentar e percentual de ganho de peso em relação ao peso inicial foi avaliado por meio do ajustamento de retas de regressão linear simples, utilizando-se o tempo em dias como variável dependente. Após o ajustamento das retas, os coeficientes de regressão e interceptos dos grupos foram comparados dois a dois pelo teste t de Student, empregando-se o software Biostat 5.3 e adotando-se o valor de 5% de significância (Ayres et al., 2007).

Histomorfometria intestinal

Inicialmente, todos os grupos de dados foram submetidos ao teste de Saphiro-Wilk para assegurar o pressuposto de normalidade dos dados. Para determinar se as variáveis observadas na análise histológica diferiram entre os tratamentos, recorreu-se ao teste de análise de variância em uma via (ANOVA *one-way*) com contrastes pelo método de Tukey. O pressuposto de homogeneidade de variâncias (homocedasticidade), necessário à realização da ANOVA, foi validado pelo teste de Levene. As variáveis que apresentaram heterocedasticidade realizou-se a correção de Welch para a correção dos graus de liberdade e realização de contrastes pelo método de Games-Howell. Todas as análises foram conduzidas no programa SPSS v. 13.0 *for Windows*, adotando-se o valor de 5% de significância (Field, 2009).

Resultados e discussão

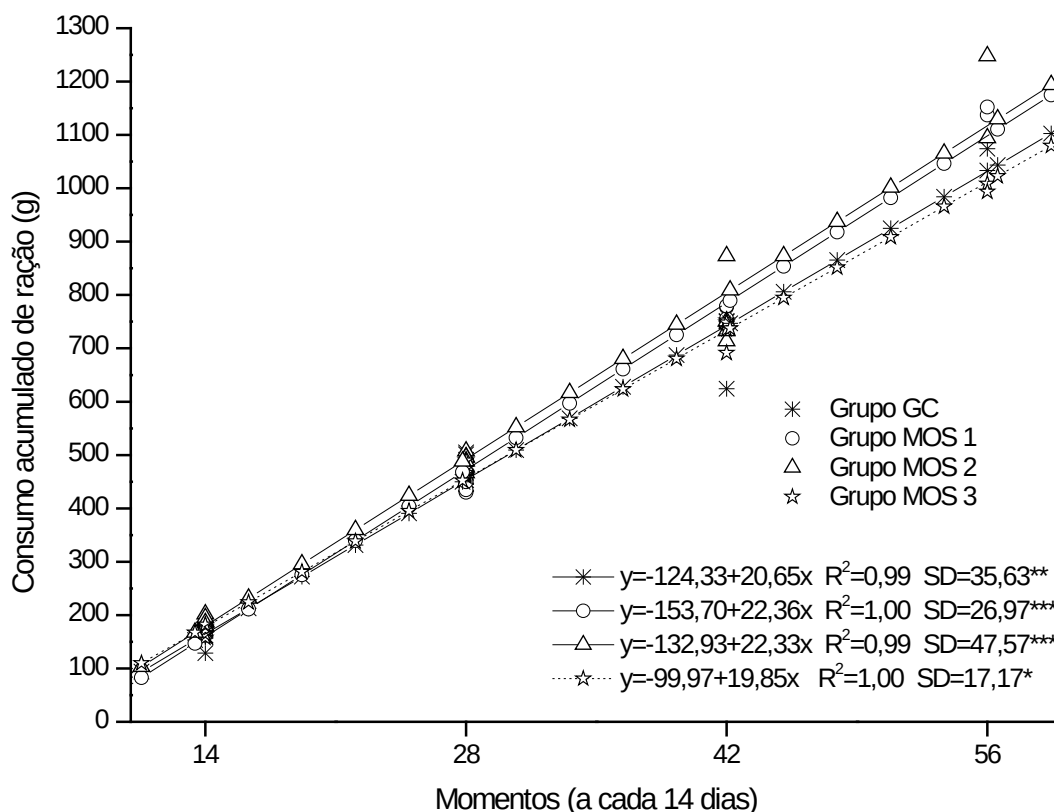
Os resultados dos parâmetros zootécnicos e comparação estatística das regressões ajustadas do consumo acumulado de ração, percentual de ganho de peso, índice de conversão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar, são apresentadas nas Figuras 1, 2, 3 e 4 e Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2. Médias e desvios padrão do consumo acumulado de ração, em gramas, de ratos Wistar, em função dos momentos (a cada 14 dias), para ajustamento das equações de regressões lineares.

Tratamento	Momentos (dias)			
	14	28	42	56
GC	161,93 ± 15,56	468,61 ± 27,36	715,58 ± 61,31	1053,71 ± 28,85

GM1	172,61 ± 6,98	452,37 ± 21,43	765,58 ± 14,91	1144,76 ± 10,51
GM2	187,84 ± 7,54	488,26 ± 14,73	767,60 ± 72,02	1170,97 ± 108,51
GM3	171,55 ± 8,93	469,33 ± 11,38	731,80 ± 27,81	1000,92 ± 10,66

Os resultados do consumo acumulado de ração em ratos nos 56 dias experimentais do grupo GM2 foram significativamente maior do que os grupos GC e GM3 e não diferiram do GM1, indicando que os prebióticos utilizados não apresentaram homogeneidade neste parâmetro. Em frangos, Barbosa et al. (2011), não verificaram um maior consumo de ração no grupo de animais suplementados com MOS na fase inicial (1 a 21 dias de idade). Silva et al. (2012) e Bovera et al. (2012), em estudo com leitões e coelhos, respectivamente, não observaram diferenças significativas no consumo de ração entre os animais suplementados ou não com MOS.



Nota: *Grupo MOS 3 diferiu significativamente dos Grupos MOS 1 ($P=0,0041$) e MOS 2 ($P=0,0001$). **Grupo GC diferiu significativamente somente do grupo MOS 2 ($P=0,0219$). ***Grupos MOS 1 e MOS 2 não diferiram significativamente entre si ($P=0,9714$).

Figura 1. Regressões lineares simples utilizando o tempo em dias como variável dependente sobre o consumo acumulado de ração dos grupos Controle, MOS 1, MOS 2 e MOS 3.

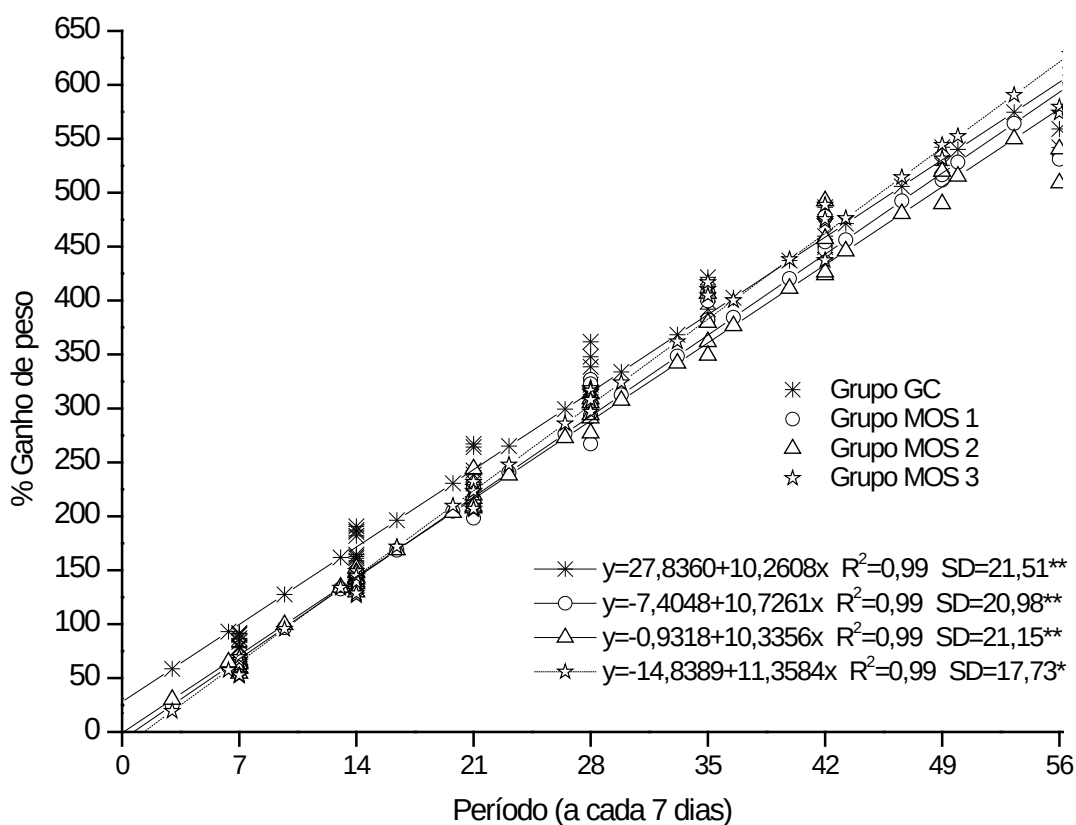
O fato dos animais do grupo GM2 apresentarem uma maior inclinação da reta no parâmetro de consumo acumulado de ração, possivelmente possa este resultado estar relacionado com sua composição, pois o MOS 2 é constituído pela fração ativa do mananoligossacarídeo, ou seja, fração alfa 1,3 e alfa 1,6 mananoproteína, que atua diretamente sobre as bactérias patogênicas e os produtos MOS 1 e MOS 3 são constituídos por polissacarídeos não-amiláceos (PNAs), β -glucanos (polímeros lineares de glicose) e os α -mananos (polímeros de glicose e

manose) e segundo Silva e Nörnberg (2003), estes componentes podem levar a um aumento da viscosidade do bolo alimentar, diminuindo a velocidade de transito e consequentemente, diminuindo o consumo.

Tabela 3. Médias e desvios padrão dos resultados do percentual de ganho de peso, de ratos Wistar em função dos dias, para ajustamento das equações de regressões lineares.

Tratamentos	Pesagens (dias)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
GC	84,9 ± 5,7	174,0 ± 13,4	244,6 ± 17,5	332,2 ± 20,6	406,9 ± 13,6	460,2 ± 18,7	533,8 ± 11,9	550,5 ± 12,1
GM1	61,1 ± 3,2	139,7 ± 5,6	213,3 ± 9,3	300,9 ± 22,0	392,9 ± 13,1	464,1 ± 15,6	514,2 ± 3,5	533,6 ± 3,7
GM2	61,8 ± 3,9	141,8 ± 6,7	219,4 ± 13,1	298,3 ± 13,5	374,3 ± 25,0	450,0 ± 32,2	504,7 ± 21,3	524,8 ± 22,3
GM3	60,9 ± 7,1	138,4 ± 7,9	219,7 ± 10,7	312,2 ± 8,5	412,2 ± 5,8	468,7 ± 22,0	537,9 ± 9,0	576,9 ± 9,0

Os resultados de percentual de ganho de peso obtidos pelos ratos que receberam dieta suplementada com o MOS 3 (GM3) apresentou uma maior inclinação da reta e diferença estatística ($P < 0,05$) com os demais grupos e estes não diferiram entre si. Os MOS utilizados neste experimento também não apresentaram homogeneidade nesse parâmetro estudado, pois os grupos GM1 e GM2 não diferiram do grupo GC. Por outro lado, Nargeskhani et al. (2010) e Ghosh e Mehla (2012), observaram aumento no ganho diário de peso em bezerros, que receberam mananoligossacarídeo na dieta, quando comparados com o grupo controle. Resultados similares foram apresentados em suínos (Dvorak e Jacques, 1998) e em frangos (El-Banna et al., 2010).



Nota: *Grupo MOS 3 diferiu significativamente dos grupos GC ($P=0,0006$), MOS 1 ($P=0,0389$) e MOS 2 ($P=0,0011$).
 **Os grupos GC, MOS 1 e MOS 2 não diferiram significativamente entre si ($P>0,05$).

Figura 2. Regressões lineares simples utilizando o tempo em dias como variável dependente sobre o percentual de ganho de peso dos grupos Controle, MOS 1, MOS 2 e MOS 3.

Morrison et al. (2010), em bezerras, não demonstraram nenhuma diferença significativa no ganho de peso durante o período experimental nos animais tratados com mananoligossacarídeo, quando comparados com o grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Ramos et al. (2011), em frangos e Schwarz et al. (2011) com larvas de peixes, tilápia do Nilo.

Tabela 4. Médias e desvios padrão do índice de conversão alimentar de ratos Wistar, em função dos dias, para ajustamento das regressões lineares.

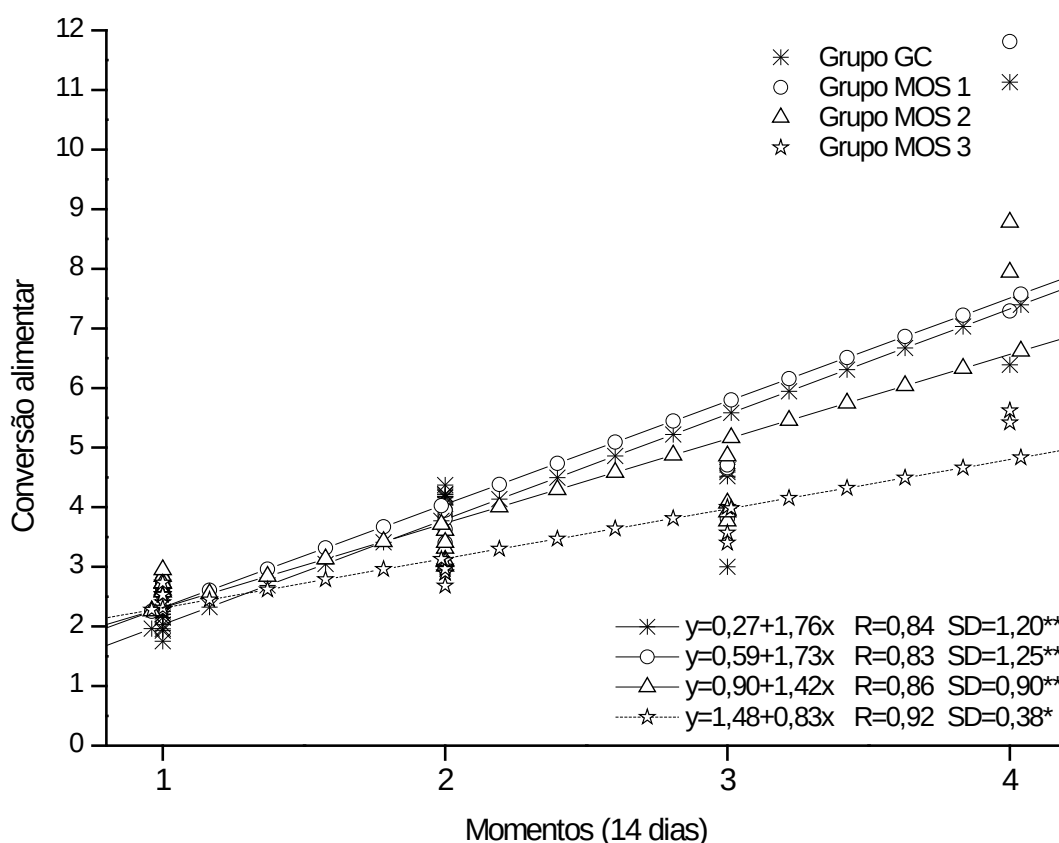
Tratamento	Momentos (dias)			
	14	28	42	56
GC	2,06 ± 0,17	4,20 ± 0,10	4,18 ± 0,79	8,76 ± 3,31
GM1	2,68 ± 0,09	3,77 ± 0,22	4,46 ± 0,43	9,55 ± 3,20
GM2	2,72 ± 0,13	3,26 ± 0,23	4,16 ± 0,49	8,36 ± 0,59
GM3	2,48 ± 0,15	2,93 ± 0,14	3,59 ± 0,28	5,52 ± 0,14

A melhor resposta do grupo GM3 sobre o percentual de ganho de peso, estabelecida através da inclinação da reta, pode ser devido a algum componente diferente presente em sua composição, ou então diferenças nas cepas de levedura utilizadas ou até mesmo pelos diferentes processos de produção do mananoligossacarídeo, o que pode levar a uma resposta diferente nos animais que o consumiram.

Dados de conversão alimentar apresentados em estudos realizados em frangos (Barbosa et al., 2011), suínos (Silva et al., 2012), bovinos (Ghosh et al., 2012) e peixes (Schwarz et al., 2011) corroboram com os resultados obtidos de conversão alimentar neste estudo no grupo GM3 quando comparado com o grupo GC.

Porém os outros grupos tratados, GM1 e GM2, não apresentaram diferença estatística significativa com o GC e estes resultados corroboram com os obtidos por Bovera et al. (2012) em coelhos, que não encontraram diferença significativa no parâmetro conversão alimentar entre os grupos tratados com MOS e o grupo controle.

Esse melhor resultado de conversão alimentar dos animais tratados com o MOS 3 pode ser explicado, segundo Schwarz et al. (2011), pelo melhor aproveitamento das dietas, em razão do tempo de transito, da digestibilidade e da taxa de absorção dos nutrientes da dieta.



Nota: *O grupo MOS 3 diferiu significativamente dos Grupos GC ($P=0,0021$), MOS 1 ($P=0,0108$) e MOS 2 ($P=0,0039$).
 **Os grupos GC, MOS 1 e MOS 2 não diferiram entre si ($P>0,05$).

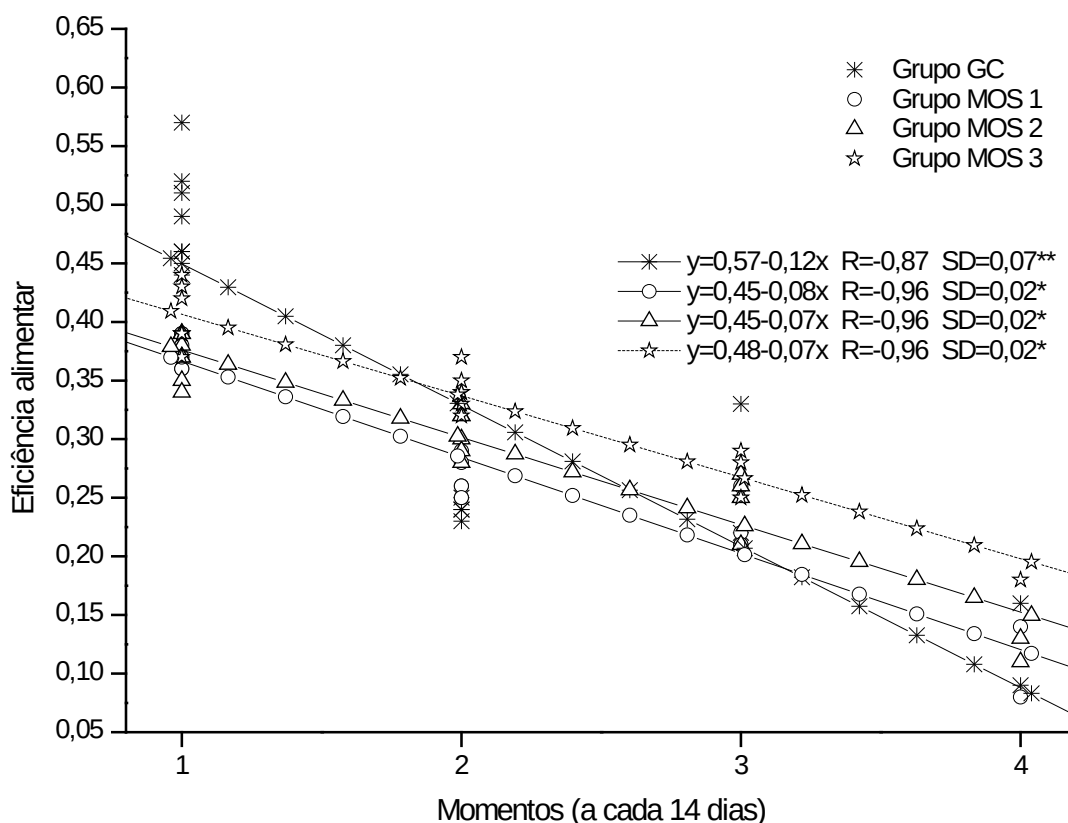
Figura 3. Regressões lineares simples utilizando o tempo em dias como variável dependente sobre a taxa de conversão alimentar dos grupos Controle, MOS 1, MOS 2 e MOS 3.

Foi observado efeito ($P < 0,05$) da suplementação do MOS sobre a eficiência alimentar. Resultados semelhantes foram encontrados por Miguel et al. (2004) e Castillo et al. (2008) em leitões.

Tabela 5. Médias e desvios padrão dos resultados do coeficiente de eficiência alimentar de ratos Wistar, em função dos dias, para ajustamento das regressões lineares simples.

Tratamento	Momentos (dias)			
	14	28	42	56
GC	$0,49 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,05$
GM1	$0,37 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,04$
GM2	$0,37 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$
GM3	$0,40 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,00$

De modo geral, a melhora no desempenho dos animais que receberam MOS na dieta pode ser resultado da modulação da microbiota intestinal, uma vez que dietas com MOS podem levar a um aumento na população de lactobacilos e bifidobactérias, além de reduzir a colonização de bactérias patogênicas (Baurhoo et al., 2007 a;b), prevenindo processos patológicos que possam atrapalhar o desempenho dos animais, e possivelmente, proporcionando maior uniformidade da mucosa, com vilos maiores e mais largos, podendo, dessa forma, aumentar a superfície de contato dos vilos com os nutrientes, levando a uma maior absorção e consequentemente, um melhor desempenho.



Nota: *Os grupos MOS 3, MOS 2 e MOS 1 não diferiram significativamente entre si ($P>0,05$). ** O grupo GC diferiu significativamente dos grupos MOS 1 ($P=0,0102$), MOS 2 ($P=0,0295$) e MOS 3 ($P=0,0043$).

Figura 4. Regressões lineares simples utilizando o tempo em dias como variável dependente sobre o coeficiente de eficiência alimentar dos grupos Controle, MOS 1, MOS 2 e MOS 3.

Histomorfometria intestinal

Observou-se que a suplementação de MOS em ratos resultou em maior altura e área de vilos ($P<0,05$) no grupo GM3 quando comparado com o grupo GC. Resultados observados por Schwarz et al. (2010), em peixes juvenis de tilápia do Nilo, suplementados com MOS, também resultou em maior altura de vilos quando comparados com os resultados dos peixes que receberam a dieta isenta de

prebióticos. Yilmaz et al. 2007 encontraram maior altura de vilosidades em trutas alimentadas com MOS na dieta. Resultados semelhantes com frangos foram obtidos por Santos et al. (2013).

Schwarz et al. (2011), verificaram que com o aumento nos níveis de inclusão de MOS nas dietas para larvas de tilápia, proporcionou efeitos quadráticos sobre os dados da altura das vilosidades.

O aumento na altura das vilosidades duodenais observado no grupo GM3 pode estar relacionado ao efeito trófico proporcionado pelo MOS sobre a mucosa intestinal, como verificado por Spring et al. (2000) e Santin et al. (2001) em frangos de corte aos sete dias de idade.

Os grupos suplementados com MOS (GM1 e GM2) não apresentaram diferença significativa com o grupo GC corroborando com os resultados obtidos por Chiquieri et al. (2007) e Santos et al. (2010), que não encontraram efeitos dos tratamentos sobre a altura das vilosidades ($P>0,05$), em suínos alimentados com prebiótico.

Não foi encontrado nenhuma literatura que referenciasse a área dos vilos em ratos e outras espécies animais com a utilização de prebióticos, porém nesse estudo observamos que o grupo GM3 diferiu significativamente ($P<0,05$) do grupo GC e não dos demais grupos que foram suplementados com MOS. A escolha de mensuração da área e não do perímetro ou diâmetro dos vilos, é pelo fato da área dos vilos estar diretamente relacionada com a superfície de contato com os nutrientes, sendo assim, quanto maior a área dos vilos maior será sua superfície de contato.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostraram não ter sido observado efeito ($P>0,05$) quanto à profundidade de cripta com a utilização de MOS,

quando comparados entre si e com o grupo controle. Em frangos, Ramos et al. (2011), demonstraram que a adição do MOS, na dieta de frangos, também não apresentou diferenças ($P>0,05$) quanto a profundidade de cripta.

Como se sabe, os prebióticos propiciam o ambiente intestinal, que favorece a proliferação de populações de bactérias benéficas, proporcionando melhores condições e longevidade das células absortivas (enterócitos), reduzindo a taxa de renovação tecidual (Markovic et al., 2009). A profundidade das criptas é correlacionada com a taxa de reposição celular e o aumento da profundidade indica a necessidade de substituição das células absortivas (enterócitos) e maior volume de renovação tecidual (Oliveira et al., 2008; Markovic et al., 2009). Sendo assim, se os ratos tivessem sido submetidos a desafios sanitários, como infecções por bactérias patogênicas, possivelmente poderia ter sido observado diferenças na profundidade de cripta entre os tratamentos, como foi observado por Santos et al., 2013, que verificaram maior profundidade das criptas duodenais nos frangos infectados por *Salmonella enterica* Enteritidis e que não foram suplementados com MOS, e os animais infectados por *Salmonella* e suplementados com MOS, apresentaram profundidade de cripta similar aos frangos do grupo controle que não foram infectados.

As respostas do número de células caliciformes/vilo, obtidas pelos ratos que receberam as dietas com MOS, encontradas nesse estudo, não diferiram entre si ou com o grupo GC. Schwarz et al. (2010) correlacionou o número de células caliciformes com à altura de vilosidades intestinais e observou serem proporcionais em peixes. Segundo Baurhoo et al. (2007b; 2009), o MOS possui a capacidade de aumentar o número de células caliciformes na membrana do vilo em frangos, porém neste estudo, com ratos, isso não foi observado.

Tabela 6. Médias e desvios padrão dos parâmetros histomorfométricos do segmento inicial do intestino delgado (duodeno), de ratos Wistar, alimentados com dietas contendo ou não mananoligossacarídeo.

Parâmetros	Tratamentos			
	GC	GM1	GM2	GM3
Altura vilo (µm)	848,6 ± 99,9 ^{1b2}	908,5 ± 98,4 ^{ab}	895,0 ± 137,1 ^{ab}	994,1 ± 121,9 ^a
Área vilo (µm ²)	144.026,2 ± 11.291,6 ^b	160.225,2 ± 14.261,5 ^{ab}	151.812,2 ± 20.305,7 ^{ab}	165.583,4 ± 14.332,5 ^a
Prof. cripta (µm)	374,14 ± 47,27 ^a	374,63 ± 8,91 ^a	385,45 ± 28,99 ^a	391,43 ± 41,60 ^a
Céls. caliciformes	24,72 ± 4,44 ^a	24,89 ± 2,87 ^a	24,06 ± 3,35 ^a	25,34 ± 5,15 ^a

¹Desvio padrão. ²Médias seguidas por letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tais incrementos nas características morfológicas do intestino dos ratos que receberam MOS na dieta são de grande importância, pois as vilosidades desempenham importante papel no processo de absorção de nutrientes no intestino delgado, sendo que o aumento desta estrutura proporciona maior superfície de contato e, como consequência, pode levar um aumento na absorção dos nutrientes no lúmen intestinal (Gartner e Hiatt, 2006; Pelicano et al., 2007; Markovic et al., 2009). Pequenos incrementos, como os observados no presente trabalho, são fundamentais para manutenção da integridade da mucosa intestinal, uma vez que determinam a dimensão da superfície de contato do intestino e, consequentemente, a capacidade digestiva e absorviva do segmento (Boleli et al 2002).

Adicionalmente, os efeitos positivos da suplementação dos animais com mananoligossacarídeo sobre a morfometria intestinal pode ser explicado pela

redução da colonização de bactérias patogênicas, pois o MOS atua inibindo sua aderência à mucosa intestinal, mantendo dessa forma, a integridade da mucosa o que leva a uma maior uniformidade de seus vilos.

Conclusões

Os resultados do presente estudo sugerem que a utilização de diferentes prebióticos, derivados de *S. cerevisiae*, em dietas de ratos Wistar, podem apresentar efeitos benéficos nos parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais. Estes benefícios foram mais significativos no grupo de animais alimentados com dieta contendo MOS 3, melhorando o parâmetro consumo de ração, percentual de ganho de peso, conversão alimentar e eficiência alimentar, quando comparado com os demais prebióticos e ou controle. Os efeitos positivos do MOS 3, podem também estar relacionados com a melhora na altura e área dos vilos duodenais, permitindo uma maior superfície de contato e incremento da absorção de nutrientes. As distintas respostas dos prebióticos nos parâmetros estudados no rato, podem estar ligados as diferentes cepas ou fragmentos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, que tornou este trabalho possível através do auxílio financeiro (FAPESP 2012/19454-9).

Referências

- Ayres, M.; Ayres Junior, M.; Ayres, D. L.; Santos, A. de A. S., 2007: BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.
- Barbosa, N. A. A.; Sakomura, N. K.; Oviedo-Rondón, E. O.; Bonato, M. A.; Kawauchi, I. M.; Dari, R. L.; Fernandes, J. B. K., 2011: Mananoligossacarídeos em dietas para frangos de corte. *Ciência Rural*, **41**, 2171–2176.
- Baurhoo, B.; Letellier, A.; Zhao, X.; Ruiz-Feria, C. A., 2007a: Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and *Escherichia coli* populations after in vivo *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry science*, **86**, 2509–2516.
- Baurhoo, B.; Phillip, L.; Ruiz-Feria, C. A., 2007b: Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poultry science*, **86**, 1070–1078.
- Baurhoo, B.; Ferket, P. R.; Zhao, X., 2009: Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poultry science*, **88**, 2262–2272.
- Boleli, I. C. Estrutura funcional do trato digestório. In: *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E., 2002. editores. 3ª Ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, p.75-95.
- Bovera, F.; Lestingi, A.; Marono, S.; Iannaccone, F.; Nizza, S.; Mallardo, K.; de Martino, L.; Tateo, A., 2012: Effect of dietary mannan-oligosaccharides on in vivo performance, nutrient digestibility and caecal content characteristics of growing rabbits. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, **96**, 130–136.
- Castillo, M.; Martín-Orúe, S. M.; Taylor-Pickard, J. A.; Pérez, J. F.; Gasa, J., 2008: Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *Journal of animal science*, **86**, 94–101.
- Chen, C.; Fang, R.; Davis, C.; Maravelias, C.; Sibley, E., 2009: Pdx1 inactivation restricted to the intestinal epithelium in mice alters duodenal gene expression in enterocytes and enteroendocrine cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **297**, G1126–37.
- Chiquieri, J., Soares, R.T.R.N., Hurtado Nery, V.L., Carvalho, E.C.Q., Costa, A. P. D., 2007: Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **8**, 97–104.

Clarke, R. M., 1977: The effects of age on mucosal morphology and epithelial cell production in rat small intestine. *Journal of anatomy.*, **123**, 805–811.

Coppa, G. V; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Facinelli, B.; Ferrante, L.; Capretti, R.; Orazio, G., 2006: Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatric research.*, **59**, 377–382.

Dvorak, R.; Jacques, K.A., 1998: Mannanoligosaccharide, fructooligosaccharides, and Carbadox for pigs days 0-21 post-weaning. *Journal of Animal Science.*, **76**, 64.

El-Banna, H.A.; El-Zorba, H.Y.; Attia, T.A.; Elatif, A.A., 2010: Effect of probiotic, prebiotic and symbiotic on broiler performance. *World Applied Sciences Journal.*, **11**, 388-393.

Falcão-e-Cunha, L.; Castro-Solla, L.; Maertens, L.; Marounek, M.; Pinheiro, V.; Freire, J.; Mourão, J. L., 2007: Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: A review. *World Rabbit Science.*, **15**, 127–140, 2007

Ferket, P. R.; Lyons, T. P.; Jacques, K. A., 2004: Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. *Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: re-imagining the feed industry, Lexington, Kentucky, USA, 23-26 May 2004.* Alltech UK, pp. 57–67.

Field, A., 2009: *Descobrimos a estatística usando o SPSS* 2nd edn. Artmed, Porto Alegre, p. 688.

Fuller, R., 1989: Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology.*, **66**, 365–378.

Gartner, L.P., Hiatt, J. L., 2006: *Color Textbook of Histology: With STUDENT CONSULT Online Access, 3e [Paperback]*. Saunders; 3 edition, p. 592.

Ghosh, S.; Mehla, R. K., 2012: Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannanoligosaccharide) on the performance of crossbred calves. *Tropical animal health and production.*, **44**, 617–622.

Ghosh, T. K.; Haldar, S.; Bedford, M. R.; Muthusami, N.; Samanta, I., 2012: Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *Journal of animal physiology and animal nutrition.*, **96**, 275–284.

Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B., 1995: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition.*, **125**, 1401–1412.

Guarner, F., 2007: Prebiotics in inflammatory bowel diseases. *The British journal of nutrition.*, **98 Suppl 1**, S85–9.

Guillaumon, A. T.; Couto, M. A., 2013: Hystopathological study of the intestinal epithelium submitted to different times of programmed ischemia and twenty four

hours reperfusion. *Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia.*, **28**, 288–298.

Hooge, D. M., 2003: Dietary MOS may have application in turkey diets. (Nutrition and Health/Poultry).(mannanoligosaccharides growth promoter), **75**.

Hooge, D. M., 2004: Meta-analysis of Broiler Chicken Pen Trials Evaluating Dietary Mannan Oligosaccharide, 1993-2003. *International Journal of Poultry Science.*, **3**, 163–174.

Hooge, D. M., 2006: MOS may boost calf gain: Mannanoligosaccharides had beneficial effects on dairy calf weight gain and total starter feed intake, but mortality needs to be further evaluated.(mannanoligosacchides).

Hooge, D.M., 2009: Dietary MOS analyses for broilers updated. *Feedstuffs.*, **81**.

Iji, P. A.; Saki, A. A.; Tivey, D. R., 2001: Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, **81**, 1186–1192.

Kaminski, T. A.; Silva, L. P. da; Bagetti, M.; Monego, M. A.; Moura, G. B. de, 2008: Diferentes formulações de multimisturas sobre a resposta biológica em ratos. *Ciência Rural.*, **38**, 2327–2333.

Kogan, G.; Kocher, A., 2007: Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science.*, **109**, 161–165.

Markovic, R.; Sefer, D.; Krsti, M.; Petrujki, B., 2009: Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Archivos de Medicina Veterinaria.*, **41**, 163–169.

Merusse, J. L. B., Lapichick, V. B. V., 1996: Instalações e equipamentos. In: COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2. ed. São Paulo: EPM, 15-25.

Miguel, J. C.; Rodriguez-Zas, S. L.; Pettigrew, J. E., 2004: Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. *Journal of Swine Health and Production.*, **12**, 296 – 307.

Morrison, S. J.; Dawson, S.; Carson, A. F., 2010: The effects of mannan oligosaccharide and *Streptococcus faecium* addition to milk replacer on calf health and performance. *Livestock Science.*, **131**, 292–296.

Mourão, J. L.; Pinheiro, V.; Alves, A.; Guedes, C. M.; Pinto, L.; Saavedra, M. J.; Spring, P.; Kocher, A., 2006: Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology.*, **126**, 107–120.

Nargeskhani, A.; Dabiri, N.; Esmailkhanian, S.; Alipour, M. M.; Bojarpour, M., 2010: Effects of Mannanoligosaccharide– β Glucan or Antibiotics on Health and Performance of Dairy Calves. *Animal Nutrition and Feed Technology.*, **10**, 29–36.

Oliveira, M. C.; Rodrigues, E. A.; Marques, R. H.; Gravena, R. A.; Guandolini, G. C.; Moraes, V. M. B., 2008: Performance and morphology of intestinal mucosa of broilers

fed mannan-oligosaccharides and enzymes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, **60**, 442–448.

Paiva, F. P.; Maffili, V. V.; Santos, A. C. S., 2005: *Curso de manipulação de animais de laboratório*. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador – BA, maio 2005. Disponível em: http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio_apostila.pdf

Parks, C. W.; Grimes, J. L.; Ferket, P. R.; Fairchild, A. S., 2001: The effect of mannanoligosaccharides, bambarmycins, and virginiamycin on performance of large white male market turkeys. *Poultry science.*, **80**, 718–723.

Pelicano, E.; Souza, P.; Souza, H.; Figueiredo, D.; Amaral, C., 2007: Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. *Revista Brasileira de Ciência Avícola.*, **9**, 173–180.

Ramos, L. de S. N.; Lopes, J. B.; Silva, S. M. M. de S.; Silva, F. E. S.; Ribeiro, M. N., 2011: Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, **40**, 1738–1744.

Rehman, H.; Vahjen, W.; Kohl-Parisini, A.; Ijaz, A.; Zentek, J., 2009: Influence of fermentable carbohydrates on the intestinal bacteria and enteropathogens in broilers. *World's Poultry Science Journal.*, **65**, 75–90.

Santin, E.; Maiorka, A.; Macari, M.; Grecco, M.; Sanchez, J. C.; Okada, T. M.; Myasaka, A. M., 2001: Performance and Intestinal Mucosa Development of Broiler Chickens Fed Diets Containing *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *The Journal of Applied Poultry Research.*, **10**, 236–244.

Santos, V. M. dos; Thomaz, M. C.; Pascoal, L. A. F.; Ruiz, U. dos S.; Watanabe, P. H.; Huaynate, R. A. R.; Silva, S. Z. da; Faria, H. G. de, 2010: Digestibilidade, desempenho e características morfofisiológicas do trato digestório de leitões desmamados sob dietas com mananoligossacarídeo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.*, **45**, 91–105.

Santos, E. G.; Costa, F. G. P.; Silva, J. H. V; Martins, T. D. D.; Figueiredo-Lima, D. F.; Macari, M.; Oliveira, C. J. B.; Givisiez, P. E. N., 2013: Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella Enteritidis* in chicks is improved by higher dietary threonine levels. *Journal of applied microbiology.*, **114**, 1158–1165.

Schwarz, K. K.; Furuya, W. M.; Natali, M. R. M.; Michelato, M.; Gualdezi, M. C., 2010: Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. *Acta Scientiarum. Animal Sciences.*, **32**, 197–203.

Schwarz, K. K.; Furuya, W. M.; Natali, M. R. M.; Gaudenzi, M. C.; Lima, P. A. G. de, 2011: Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, **40**, 2634–2640.

Silk, D. B. A.; Davis, A.; Vulevic, J.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., 2009: Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and

symptoms in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics.*, **29**, 508–518.

Silva, L. P. da; Nörnberg, J. L., 2003: Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciência Rural.*, **33**, 983–990.

Silva, S. Z. da; Thomaz, M. C.; Watanabe, P. H.; Huaynate, R. A. R.; Ruiz, U. dos S.; Pascoal, L. A. F.; Santos, V. M. dos; Masson, G. C. I. H., 2012: Mananoligossacarídeo em dietas para leitões desmamados. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.*

Sims, M. D.; Dawson, K. A.; Newman, K. E.; Spring, P.; Hoogell, D. M., 2004: Effects of dietary mannan oligosaccharide, bacitracin methylene disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys. *Poultry science.*, **83**, 1148–1154.

Spring, P.; Wenk, C.; Dawson, K. A.; Newman, K. E., 2000: The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry science.*, **79**, 205–211.

Tolosa, E.M.C.; Rodrigues, C.J.; Behmer, O.A.; Neto, A.G.F., 2003: *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 2ª ed. São Paulo. 331p.

Vardakou, M.; Dumon, C.; Murray, J. W.; Christakopoulos, P.; Weiner, D. P.; Juge, N.; Lewis, R. J.; Gilbert, H. J.; Flint, J. E., 2008: Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases. *Journal of molecular biology.*, **375**, 1293–1305.

Yilmaz, E.; Genc, M.A.; Genc, E., 2007: Effects of Dietary Mannan Oligosaccharides (MOS) on Growth, Body Composition, Intestine and Liver Histology of Rainbow Trout, *Onchoryncus mykiss* (Walbaum). *The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh.*, **59**, 183 – 189.

ANEXO A – Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).



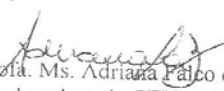
Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

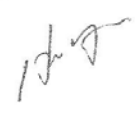
PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "O EFEITO DO PREBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE RATTUS NOVERGICUS LINHAGEM WISTAR" cadastrado no PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PROBIC) e PROGRAMA DE PESQUISA DE PÓS-GRADUAÇÃO (PPG) da Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 1173 (online) tendo como pesquisador responsável o Prof. Dr. HERMANN BREMER NETO, o Prof. Dr. PAULO EDUARDO PARDO e os acadêmicos GABRIEL ZANUTO SAKITA e TALITA RIBEIRO DE ALBUQUERQUE foi avaliado e APROVADO nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP, em reunião realizada em 30/05/2012.

Presidente Prudente, 06 de junho de 2012.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE



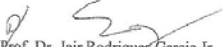


Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "O efeito do prebiótico sobre as vilosidades intestinais de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar" cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número nº 1178 tendo como pesquisador responsável o Prof. HERMANN BREMER NETO, a docente participante GISELE ALBORGHETTI NAI, o mestrando GABRIEL ZANUTO SAKITA e a acadêmica DANIELA CUSTÓDIO MEIRA foi avaliado e APROVADO nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP.

Presidente Prudente, 14 de janeiro de 2013.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a qual o artigo será submetido

JOURNAL OF ANIMAL PHYSIOLOGY AND ANIMAL SCIENCE

ISSN: 1439-0396

Normas para publicação

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition

© Blackwell Verlag GmbH



Edited By: Michel Goldberg

Impact Factor: 1.254

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 15/54 (Agriculture Dairy & Animal Science); 50/143 (Veterinary Sciences)

Online ISSN: 1439-0396

Author Guidelines

The Author Guidelines can also be downloaded as a PDF file here: **JAPAN Author Guidelines**
(http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAPAN_Author_Guidelines.pdf)

Downloads: Colour Work Agreement Form
(http://media.wiley.com/assets/7130/56/SN_Sub2000_F_CoW.pdf); **Page Charge Form**
(http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JPN_Page_Charge_Form.pdf)

The *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to the Journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism.

1. GENERAL

As an international forum for hypothesis-driven scientific research, the journal publishes original papers on basic research in the fields of animal physiology, the biochemistry and physiology of nutrition, animal nutrition, feed technology, and feed preservation. In

addition, reviews of the most important specialized literature are included. The language of publication is English.

2. SUBMISSION AND ACCEPTANCE OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) (<http://mc.manuscriptcentral.com/japan>). The use of an online submission and peer review site speeds up the decision-making process, enables immediate distribution and allows authors to track the status of their own manuscripts. If assistance is needed (or if for some reason online submission is not possible), the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

Editorial Office:
Prof. Dr. Michel Goldberg
University of Munich, Munich, Germany
E-mail: michel-goldberg@t-online.de (<mailto:michel-goldberg@t-online.de>)

2.1 Online Submission

To submit a manuscript, please follow the instructions below.

Getting Started

1. Launch your web browser (Internet Explorer 5 or higher or Netscape 7 or higher) and go to the journal's ScholarOne Manuscripts homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/japan> (<http://mc.manuscriptcentral.com/japan>)).
2. Log-in or click the "Create Account" option if you are a first-time user of ScholarOne Manuscripts.
3. If you are creating a new account:
 - After clicking on "Create Account", enter your name and e-mail information and click "Next". Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click "Next."
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click "Finish".
4. Log-in and select "Author Center."

Submitting Your Manuscript

5. After you have logged in, click the "Submit a Manuscript" link in the menu bar.
6. Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
7. Click the "Next" button on each screen to save your work and advance to the next screen.
8. Give the contact details of at least three reviewers who are independent from your group.
9. Upload your files:
 - Click on the "Browse" button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the "Upload Files" button.
10. Review your submission (in PDF format) before sending to the Journal. Click the "Submit" button when you are finished reviewing.

You may suspend a submission at any phase before clicking the “Submit” button and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation e-mail. You can also access ScholarOne Manuscripts at any time to check the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc/.docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

2.2 Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp
(http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp (http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html> (<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>).

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome

Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit:
<http://www.wiley.com/go/funderstatement>. (<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.)

2.3 Page Charges

Original research articles exceeding 8 pages when in proof will be subject to a page charge of GBP100 per additional page. The first 8 print pages will be published free of charge. An average 8-page article will have approximately 6300 words in manuscript, with approximately 5 figures or tables and 40 references. Once your article has been typeset and you receive confirmation of the page extent, please complete the [Page Charge Form](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JPN_Page_Charge_Form.pdf) (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JPN_Page_Charge_Form.pdf) if your article exceeds 8 pages. An invoice will be sent to authors for these charges upon print publication of their article. Invited and review articles are excluded from this charge.

2.4 Authorship

All authors listed must conform to the authorship requirements as set out by the ICMJE [here](http://www.icmje.org/ethical_1author.html) (http://www.icmje.org/ethical_1author.html).

3. REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS

3.1. Types of Articles

Original Articles

Original articles represent the most common form of articles published in the journal. Typically they describe the results of experiments carried out in order to test a novel hypothesis. Original articles should contain the following sections: Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References.

Review Articles

The journal welcomes review articles on topics of high current interest within the scope of the journal. Review articles must also include a Summary, Introduction and References, but the other headings may be chosen depending on the structure of the article.

Short Communications

Short communications are brief articles that present particularly novel or exciting results, introduce new theories or ideas, or offer new methodological approaches. This format provides an opportunity for authors to (a) provide important results in concise form or (b) introduce significant new concepts or methods that are supported by a limited empirical data set. The papers should be highly original and represent ideas that will challenge current paradigms or approaches. They should stimulate thought, serving as precursors to new research programs or working groups. In these manuscripts the headings required for original articles may be omitted, but the structure of the paper should more or less be the same. The length of the short communication should not exceed 3500 words plus 1-2 tables or figures.

3.2. General Guidelines on Format

Prepare your manuscript by numbering lines and pages consecutively and use double spacing throughout the text body. It is strongly advised that you consult other articles in the journal showing the format required. A free sample issue of the journal can be

accessed for this purpose from the link at the left of the journal's home page ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0396](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0396)).

Title page

The title should not exceed 35 words. Please provide a short title of 60 characters or less for the running head. List all the authors and their affiliations, and indicate the corresponding author by a footnote named “correspondence” where name, the complete postal address, telephone and fax numbers as well as e-mail address are given.

Summary

The summary should not exceed 300 words, while giving the major objectives, methods, results, conclusions and practical applications of the research.

Keywords

Include up to 6 keywords. Keywords will be used for indexing purposes, as will the title; therefore please select words that are not included in the title.

Acknowledgements

Include any acknowledgement before the reference list.

Figures and table captions

Each figure and table must have a reference in the text and should be numbered in accordance with their appearance in text. Please do not insert figures into the text file. The legends of all figures should be given on a separate page after the list of references.

Tables

Use separate pages for each table and put them at the end of the manuscript. Use no vertical lines and few horizontal lines (mainly above and below the table heading and at the end of the table). Footnotes have to be written below the table body. They should be given by using the following symbols in this order: *, †, ‡, §, ¶, **, ††, ‡‡, etc.

Supporting Information

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp> (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>)

3.3. Statistics, Units, Abbreviations and Nomenclature

Descriptions of the statistical evaluation of results should be accompanied by the name of the computer software and the procedures applied (one- two-factorial ANOVA, Tukey's test etc.). Average values given in tables should be accompanied by the standard deviation (SD) values, or in experiments where the greater number of samples (animals, units etc.) have been considered, the SEM value as well as probability P should be given.

All units of measurement must follow the SI system. Concentrations of solutions should be given as molar concentrations. All other concentrations should be expressed as percentages.

Abbreviations of biological, medical, chemical, and other terms should only be used when such abbreviations are both internationally recognized and unambiguous. The first use of an abbreviation must be explained by also giving the unabbreviated term. All biological, medical, chemical, and other names should be given in keeping with the latest international nomenclature. If an animal is being mentioned in the text for the first time, the binomial name should be given, e.g. carp (*Cyprinus carpio* L.). Thereafter, this can be abbreviated to *C. carpio*.

3.4. Figures and Illustrations

Do not display the same information in both a table and figure. Use separate pages for each figure and illustration.

Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Photographic material should be of such quality that high-contrast reproductions can be made; photostats of photographs are unacceptable.

Figures printed in colour are subject to an added charge. Colour print charges are explained on the [Colour Work Agreement Form](http://media.wiley.com/assets/7130/56/SN_Sub2000_F_CoW.pdf) (http://media.wiley.com/assets/7130/56/SN_Sub2000_F_CoW.pdf). Colour graphics should be in RGB mode. RGB stands for Red, Green and Blue – these are the colours that are displayed by computer monitors. Monochrome art (black on white) should be in ‘bitmap’ mode (also called 1-bit). Grayscale art should be in ‘grayscale’ mode, a palette of colours that has 256 shades ranging from white to black (also called 8-bit). There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher.

Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations.

Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure. If figures or tables are taken from another publication, the source must be mentioned.

3.5. References

Each original contribution and short communication should contain a bibliography, reduced to the essential minimum. All references in text must have a corresponding bibliographic entry in the list of references. The name of a journal in which a paper appears should be written out in full.

The references should be given in alphabetical order, and should give the full title of the paper. If there is more than one reference by the same author(s) the name(s) must not be substituted by a dash but given in full. Prefixed names such as O'Brien, Van der Fecht, D'Estaing etc. should be arranged on the basis of the first letter of the main part of the name, thus, D'Estaing would appear under 'E', not 'D'. Anonymous articles should be cited at the beginning of the bibliography.

References should be given in the following form:

a. From journals: Surname, initials of the author(s) first name(s), year of publication, title of article, title of journal, volume number in bold, page range of the article. Please pay attention to the punctuation in the following example:

Revy, P.S.; Jondreville, C.; Dourmad, J.Y.; Guinotte, F.; Nys, Y., 2002: Bioavailability of two sources of zinc in weanling pigs. *Animal Research* 51, 315–326.

b. From books and other non-serial publications: Surname, initials of author(s) first name(s), year of publication: title, edition number (if it is not the first edition), volume number (if the title contains more than one volume), publisher, and place of publication. Please pay attention to the punctuation in the following examples:

Underwood, E. J.; Suttle, N. F., 1999: *The Mineral Nutrition of Livestock*, 3rd edn. CABI publishing, NY, USA.

Citations from handbooks, serial books, and proceedings must contain the names of the editors:

Edwards, C., 1990: Mechanisms of action on dietary fibre on small intestinal absorption and motility. In: Furda, I. (ed.), *New Developments in Dietary Fiber*. Plenum Press, New York. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 270, 95–104.

Unpublished works must have already been accepted for publication and marked as 'in press'. The citation of personal communications and unpublished data must be confined to the body of the text.

Within the text, citations should be made by putting the surname of the author and the year of publication in parentheses, e.g. (Kienzle, 1998). With two authors, the surnames of the authors should be given, e.g. (Kienzle and Maiwald, 1998); with more than two authors, the surname of the first author should be given and followed by 'et al.', e.g. (Kirchgessner et al., 1998). If the author(s) name(s) are given within the context of the script, the year of publication should be given in parentheses, e.g. ...as described by Kienzle and Maiwald, (1998).

If various publications by the same author(s) and published in the same year are cited, a, b, c etc. must be added to the year of publication, e.g. (Kirchgessner et al., 1998 a, b). This lettering must also correspond to the same lettering within the bibliography.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager (<http://www.refman.com/>) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp> (<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>)

Please note that incorrectly formatted references in a submitted paper may result in the paper being unsubmitted.

3.6. Animal Experiments

Animal experiments are to be undertaken only with the purpose of advancing knowledge and in a manner that avoids unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. They shall be conducted in compliance with federal, state and local laws and regulations, and in accordance with the internationally accepted principles and guidelines for the care and use of agricultural, laboratory or experimental animals.

In the interests of the reproducibility of results, accurate information about any test animals used in the experiments (origin, genotype, etc.), as well as information about the housing conditions (diet, environment, etc.), should be given.

3.7. Use of the English Language

Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. Visit [our site](http://wileyeditingservices.com/en/) (<http://wileyeditingservices.com/en/>) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

4. AFTER ACCEPTANCE

4.1 Proof Correction

When the proof is ready for correction, the corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: <http://get.adobe.com/reader> (<http://get.adobe.com/reader>)

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Office within three days of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher.

4.2 Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required

fields: http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG
(http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG)

If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com
(<mailto:offprint@cosprinters.com>)

4.3 Early View (Publication Prior to Print)

The Journal is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

4.4 Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>.
(<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>.)

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:
https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp.
(https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp.) Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

4.5 Author Services

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with Wiley-Blackwell's Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>).