

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Paula Angélica Correia

**Avaliação da Resposta Inflamatória na Infecção por *Brachyspira*
hyodysenteriae em Leitões Tratados com Nutracêutico**

Belo Horizonte

2021

Paula Angélica Correia

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA INFECÇÃO
POR *Brachyspira hyodysenteriae* EM LEITÕES TRATADOS COM
NUTRACÊUTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte

2021

C824a Correia, Paula Angélica, -1989
Avaliação da resposta inflamatória na infecção por brachyspira hyodysenteriae em leitões tratados com nutracêutico/ Paula Angélica Correia, - 2021.

50 f.:il

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Patologia Animal.

Bibliografia: f.:44 a 50.

1. Suíno – Doenças - Teses – 2. Diarreia em animais -Teses - 3. Intestinos - Teses - I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Angélica Correia

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 31 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Roberto Maurício Carvalho Guedes - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Paula Roberta Giarretta

Dr.(a). Amanda Gabrielle de Souza Daniel



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Maurício Carvalho Guedes, Vice diretor(a)**, em 31/03/2021, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Roberta Giarretta, Professora do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **amanda gabrielle de souza daniel, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código Assinatura verificador **0623612** e o código CRC **FCAFE388**.

“Porque a palavra de Deus é viva e eficaz, e mais penetrante do que espada alguma de dois gumes, e penetra até à divisão da alma e do espírito, e das juntas e medulas, e é apta para discernir os pensamentos e intenções do coração.”

“E não há criatura alguma encoberta diante dele; antes todas as coisas estão nuas e patentes aos olhos daquele com quem temos de tratar.”

Hebreus 4:12,13

“A vida é um sonho, tudo o que vemos na vida materializado, primeiramente foram sonhos. E recordem, os melhores sonhos são aqueles que sonhamos acordados.”

William Soto Santiago, A vida é um sonho, 1982.

Agradecimentos

Não poderia começar um agradecimento de outra forma a não ser agradecendo a Deus, que é meu refúgio, a quem busco nos momentos difíceis, quem me sustenta e ilumina meu caminho, sem Deus nada seria possível.

A minha família que esteve comigo durante essa caminhada, em especial meus pais Antero e Marluz, que com muito amor sempre me ampararam, sendo exemplo de caráter e determinação.

As minhas irmãs Debora e Júnia, sobrinha Gabriela e avó Sebastiana, companheiras de vida que sempre apoiaram minhas escolhas, me ajudando sempre que precisei e que sempre serão minhas grandes amigas por toda eternidade.

Ao meu melhor amigo e grande amor, com que divido as conquistas e também os grandes desafios da vida, Isaque muito obrigada por estar ao meu lado nessa incrível jornada chamada vida, obrigada por todo amor e cuidado que sempre demonstrou por mim. Obrigada por acreditar e apostar nos meus sonhos tanto quanto eu.

Ao professor Roberto Guedes que me aceitou como orientada, que me proporcionou diversas oportunidades de aprendizado ao decorrer da minha formação, o senhor desempenhou um papel crucial no meu desenvolvimento profissional e pessoal. Muito obrigada pela confiança, paciência e por sua orientação. O senhor representa um grande exemplo para mim como profissional, mas também como ser humano, sempre generoso e gentil com todos, te admiro muito e me sinto imensamente honrada e feliz em tê-lo como orientador.

O que seria de um aluno de pós-graduação se não fossem os grandes companheiros de estrada que conquistamos durante essa trajetória, Marcelo e Heloísia muito obrigada meus grandes amigos, carregarei vocês comigo para sempre em meu coração.

Do mesmo modo, não poderia deixar de lembrar da minha segunda família, “família oinc” que por diversas vezes passamos mais tempo juntos do que com as nossas próprias famílias, Amanda, Matheus, Ricardo, Mirtha, Carol, Thairê, Gustavo, Camila, Barbara, Michelle, Luisa, Talita, Mariana, Javier e Lucas com certeza nossa convivência diária e nossos momentos de descontração tornaram o caminho até aqui mais bonito.

Gostaria de deixar um agradecimento especial ao meu companheiro de bancada e grande amigo Matheus, com quem dividi momentos de trabalho e descontração, conte sempre comigo.

A querida amiga Amanda a quem sempre serei grata por todo auxílio e amizade.

Aos colegas feitos no programa de mestrado Heloísia, Jefferson, Leo, Marcelo e Sóstenes não poderia haver melhores companheiros de turma que vocês.

A todos os residentes e funcionários do departamento de patologia em especial Leimar, Natália, Valéria, Vitalina e Luiz por toda ajuda e carinho.

Aos grandes mestres, professores do departamento de patologia e tantos outros que foram grandes inspirações e contribuíram para esse momento.

A todas as pessoas e amigos que torceram por mim, que contribuíram para esta conquista seja com uma palavra amiga, um sorriso ou uma oração.

Por fim, gostaria de deixar uma homenagem aos animais que Deus me permitiu trabalhar e cuidar durante a vida. Em especial, Napoleão meu companheiro por quase 12 anos uma das grandes inspirações para que eu me dedicasse a essa linda profissão.

RESUMO

O presente estudo buscou elucidar os mecanismos envolvidos na ação protetiva e terapêutica conferida por nutracêuticos a base de fibras insolúveis sobre o trato gastrointestinal de suínos experimentalmente inoculados com *B. hyodysenteriae*. Foram utilizadas técnicas de qPCR, isolamento bacteriano, histopatologia, mensuração da concentração de enzimas antioxidantes recuperadas de raspado de mucosa intestinal e recuperação sérica de Fitc Dextran. Para realização do estudo foram utilizados 40 leitões de 21 dias de idade, randomizados e separados em quatro grupos: controle negativo, não inoculados com *B. hyodysenteriae* e não suplementados com aditivo nutracêutico (CN) (n=10); grupo suplementado com nutracêutico 7 dias antes da inoculação com *B. hyodysenteriae* (NAI) (n=10); grupo suplementado com nutracêutico após a inoculação com *B. hyodysenteriae* (NPI) (n=10); e controle positivo, inoculados com *B. hyodysenteriae* e não suplementados com nutracêutico (CP) (n=10). Os animais foram aclimatados as instalações por 7 dias, recebendo ração e água *ad libitum*. Quatorze dias após a chegada, os leitões foram inoculados com *B. hyodysenteriae*, por três dias consecutivos, ou inoculados com caldo BHI estéril (CN). Após 14 dias da primeira inoculação, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os resultados relacionados a sinais clínicos, eliminação de *B. hyodysenteriae* nas fezes dos suínos, além de manifestações de lesões macroscópicas, microscópicas e permeabilidade intestinal demonstraram que o uso de nutracêuticos a base de fibras insolúveis na alimentação de suínos inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* não foi determinante na prevenção ou tratamento de DS, não contribuindo para manutenção da integridade intestinal ou redução na eliminação do agente. Da mesma forma, as concentrações de enzimas antioxidantes Glutathione-S-transferase e Superóxido Dismutase foram superiores nos grupos CP e CN, sugerindo que o nutracêutico não forneceu proteção adicional contra o estresse oxidativo durante a DS. Entretanto, as concentrações de proteínas teciduais e lipoperoxidação apresentaram valores similares entre o grupo CN e os dois grupos com nutracêuticos, demonstrando redução do estresse oxidativo nesses grupos durante a manifestação de DS.

Palavras chaves: Disenteria suína, nutracêuticos, fibras insolúveis, *B. hyodysenteriae*, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate mechanisms involved in the protective and therapeutic action conferred by nutraceuticals based on insoluble fibers on the gastrointestinal tract of pigs experimentally inoculated with *B. hyodysenteriae*. The samples were tested by qPCR, bacterial isolation and histopathology, in addition were performed to measured antioxidant enzymes concentration recovered from intestinal mucosa scraping and FITC Dextran serum recovery, administered orally to the animals. Forty 21-day-old piglets were randomized and separated into four groups: negative control, not inoculated with *B. hyodysenteriae* and not supplemented with nutraceutical additive (CN) (n = 10); group supplemented with nutraceuticals 7 days before inoculation with *B. hyodysenteriae* (NAI) (n = 10); group supplemented with nutraceutical after inoculation with *B. hyodysenteriae* (NPI) (n = 10); and positive control, inoculated with *B. hyodysenteriae* and not supplemented with nutraceutical (CP) (n = 10). Fourteen days after arrival the animals were inoculated with *B. hyodysenteriae* during three consecutive days and the negative inoculated group received sterile BHI broth (CN). After 14 days post inoculation, all animals were euthanized and necropsied. The results related to clinical signs, fecal shedding of *B. hyodysenteriae*, gross lesions, microscopic lesions and intestinal permeability suggested that the use of insoluble fiber nutraceuticals in the feed of pigs experimentally inoculated by *B. hyodysenteriae* was not decisive in the prevention or treatment of DS, did not contributed to the maintenance of intestinal integrity nor to the reduction of elimination of the agent. The results regarding the concentrations of antioxidant enzymes Glutathione-S-transferase and Superoxido dismutase were higher in the CP and CN groups, suggesting that the nutraceutical did not provide additional protection against oxidative stress during DS. However, the concentrations of tissue proteins and lipoperoxidation were reduced in nutraceutical groups, indicating the positive effect on the oxidative stress during the onset of DS.

Keywords: Swine dysentery, nutraceuticals, insoluble fibers, *B. hyodysenteriae*, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1.	Suínos infectados experimentalmente por <i>B. hyodysenteriae</i> apresentando diarreia catarral (a) a mucohemorrágica (b).	16
Figura 2.	Secções de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i>	19
Figura 3.	Microscopia de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i>	20
Figura 4.	Microscopia de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i>	20
Figura 5.	Comparação de escore de avaliação macroscópica entre grupos de suínos infectados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i>	31
Figura 6.	Secções de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i>	31
Figura 7.	Comparação de escore composto de lesão histopatológicas.	32
Figura 8.	Microscopia de colón espiral de suínos inoculados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i>	33
Figura 9.	Comparação de escores de lesão histopatológicas isoladas.	34
Figura 10.	Representação gráfica dos 6 diferentes momentos de coleta de fezes de suínos infectados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i> e tratados com nutracêuticos.	36
Figura 11.	Comparação da recuperação de Dextrano entre grupos de leitões inoculados experimentalmente com <i>B. hyodysenteriae</i> e tratados com nutracêuticos.	37
Figura 12.	Resultados a análise de quantificação de Glutathione-S-Transferase (GST); Superóxido Dismutase (SOD); Peroxidação lipídica (LPO); Glutathione reduzida (GSH); Proteína tecidual (PT)	39

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Comparação da diferença entre medias de qPCR para *B. hyodysenteriae* de cada grupo, considerando o somatório dos resultados de todas as coletas de fezes..... 35
- Tabela 2. Comparação da recuperação de Dextrano entre grupos de leitões inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* e tratados com nutracêuticos..... 38

Lista de Abreviaturas

ATP: Trifosfato de adenosina

BHI: Brain Heart Infusion Broth

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CN: Grupo controle negativo

CO₂: Dióxido de carbono

CP: Grupo controle positivo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPI: Dias pós infecção

DS: Disenteria suína

FOX: Oxidação do ferro pelo xilenol laranja

GSH: Glutathiona Reduzida

GST: Glutathiona S Transferase

H₂: Hidrogênio

LOS: Lipooligosacarideo

LPO: Peroxidação lipídica

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MIC: Concentração inibitória mínima

N₂: Nitrogênio

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NAI: Grupo que recebeu nutracêuticos de forma preventiva

NAHCO₃: Bicarbonato de sódio

NPI: Grupo que recebeu nutracêuticos de forma terapêutica

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PT: Proteína tecidual

qPCR: PCR quantitativa em Tempo Rea

SOD: Superóxido Dismutase

TSA: Tryptic Soy Agar

Sumário

1. Introdução	14
2. Hipótese	15
3. Objetivos	15
4. Revisão de literatura	15
4.1 Disenteria Suína	15
4.2. <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	16
4.3. Epidemiologia da DS	17
4.4. Patogenia	18
4.5. Patologia	19
4.6. Fatores de virulência <i>B. hyodysenteriae</i>	21
4.7. Diagnóstico de DS	22
4.8. Controle e Tratamento da DS	22
4.9. Nutracêuticos	23
5. Material e Métodos	25
5.1. Animais e Delineamento Experimental	25
5.2. Preparação do Inoculo e Inoculação	26
5.3. Dieta	27
5.4. Isolamento Bacteriano	27
5.5. qPCR	27
5.6. Necropsia	28
5.7. Histopatologia	28
5.8. Avaliação de Lesão Oxidativa	29
5.9. Análise de Permeabilidade Intestinal	29
5.10. Análise Estatística	29
6. Resultados	30
6.1. Avaliação Clínica	30
6.2. Achados Macroscópicos	30
6.3. Resultados de Lesões Histopatológicas	32
6.4. Avaliação de qPCR para <i>B. hyodysenteriae</i>	34
6.5. Isolamento Bacteriano	37
6.6. Resultados da Avaliação da Permeabilidade Intestinal	37
6.7. Resultados das Avaliações de Lesão Oxidativa	38
7. Discussão	39
8. Conclusão	43
9. Referências Bibliográficas	44

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior exportador de carne suína do mundo, a produção no ano de 2019 foi de 3,98 milhões de toneladas, sendo que 81% da produção foi destinada ao consumo interno e 19% direcionado a exportação, representando 750 mil toneladas (ABPA, 2020).

Doenças entéricas juntamente com doenças respiratórias representam as maiores causas de perdas na produção de suínos em todo mundo (Guedes, 2010). A Disenteria Suína (DS) é uma doença entérica causada pela *Brachyspira hyodysenteriae*, que cursa com grandes impactos econômicos na produção animal (Suh e Song, 2005; Hampson, 2012). Sendo uma doença endêmica em diversos países produtores de suínos, representa um importante entrave econômico para a indústria suinícola (Suh e Song, 2005).

A DS cursa com quadro de colite catarral fibrinohemorrágica (Lemcke et al., 1979; Hampson, 2012). A evolução da doença é rápida, em torno de 10 a 14 dias, apresentando alto índice de morbidade e mortalidade (Hampson, 2012). As manifestações clínicas da doença envolvem inicialmente diarreia pastosa de coloração amarelada, seguida de episódios de diarreia aquosa muco-sanguinolenta, hipertermia, perda de peso progressiva, apatia e desidratação, podendo evoluir à óbito ou comprometimento no desenvolvimento e redução do ganho de peso (Suh e Song, 2005).

A utilização de antimicrobianos juntamente com despovoamento total e parcial das granjas, associado a programas de desinfecção rígidos, além de um programa de biossegurança, são os meios empregados para o controle da DS. Contudo, a ocorrência de manifestações de resistência antimicrobiana vem aumentando com passar do tempo (Mahu et al., 2017; De Luca et al., 2018).

Dessa forma, são necessários estudos que contribuam para implementação de novas substâncias que promovam proteção e melhora na saúde de rebanho (Omonijo et al., 2018; ANVISA, 2018). A aplicação de nutracêuticos na alimentação animal é relativamente nova e ainda não existem pesquisas que descrevam com detalhes sua forma de atuação no organismo dos animais. Estudos recentes têm demonstrado resultados satisfatórios na utilização de nutracêuticos no combate e prevenção de doenças (Barbosa et al., 2009; Omonijo et al., 2018). Dessa forma, o presente trabalho tem o intuito de elucidar possíveis mecanismos pelos quais os nutracêuticos à base de fibras dietéticas atua na proteção e combate na infecção experimental por *B. hyodysenteriae* em suínos.

2. HIPÓTESE

Nutracêuticos à base de fibras insolúveis, através de sua ação protetiva e reparativa sobre o trato gastrointestinal, são capazes de conferir proteção contra a infecção por *B. hyodysenteriae*, assim como, atribuir efeitos curativos após a infecção.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da administração preventiva e terapêutica de nutracêuticos a base de fibras insolúveis em dietas de suínos, quanto a resposta inflamatória, ação sobre o estresse oxidativo e dano a membrana celular.

4. REVISÃO DE LITERATURA

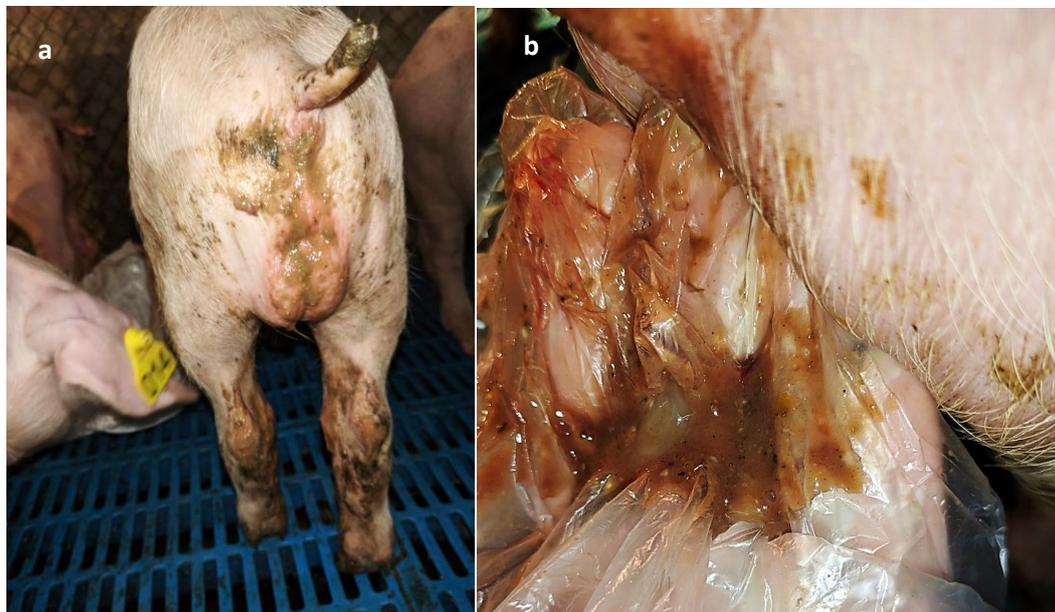
4.1 Disenteria Suína

A Disenteria Suína (DS) é uma das enfermidades entéricas mais prevalentes em suínos de recria e terminação, sendo endêmica em diversos países produtores de suínos, com prevalência em torno de 0 a 40% em planteis comerciais (Suh e Song, 2005). Acarreta significativo impacto na economia, elevando os custos de produção, adicionando gastos relacionados com tratamento, além de perdas de produtividade, como redução da conversão alimentar de 10 a 90% e do ganho de peso variando de 13% a 62% (Zlotowski et al., 2008; Bellgard et al., 2009).

A DS foi relatada pela primeira vez em 1921 por Whiting et al., (1921), contudo somente na década de 60 foram conduzidos trabalhos que referenciam as espiroquetas como agentes determinante para ocorrência de doença clínica (Terpstra et al., 1968; Alexander e Taylor, 1969).

Brachyspira hyodysenteriae é um dos principais agentes causadores da DS, com alto índice de morbidade e mortalidade que cursa com quadro de colite catarral fibrinohemorrágica (Lemcke et al., 1979; Hampson, 2012). Animais naturalmente expostos tem período de incubação variando de poucos dias a 3 meses, entretanto, geralmente manifestam a doença entre 10 a 14 dias após a infecção. Em experimentos *in vivo*, o período de incubação da doença ocorre por volta de 7 a 10 dias após a inoculação, podendo ocorrer início dos sinais clínicos a partir do terceiro dia pós-infecção. O índice de morbidade médio em casos de inoculação experimental gira em torno de 90% ou mais após três semanas de avaliação. Em média as taxas de mortalidade variam em torno de 30% a 50% (Wilcock et al., 1979; Jacobson et al., 2004; Hampson, 2012; Rubin et al., 2013). As manifestações clínicas da doença envolvem inicialmente diarreia pastosa de coloração amarelada (Fig. 1a), seguida de episódios de diarreia aquosa muco-sanguinolenta (Fig. 1b), hipertermia, perda de peso progressiva, apatia e desidratação, podendo evoluir à óbito ou comprometimento no desenvolvimento e redução do ganho de peso (Suh e Song, 2005).

No Brasil ocorrem surtos esporádicos de DS em diversos plantéis desde 1970 (Barcellos, 2000). Sendo verificados até 2010 casos esporádicos de baixa importância epidemiológica (Barcellos et al., 2000), após essa data houve o advento de surtos da doença em vários estados brasileiros (Daniel et al., 2017).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 1. Suínos infectados experimentalmente por *B. hyodysenteriae* apresentando diarreia catarral (a) a mucohemorrágica (b).

4.2. *Brachyspira hyodysenteriae*

B. hyodysenteriae representa o principal agente causador de DS, pertence à família *Brachyspiraceae*, é uma bactéria móvel possuindo 14 a 18 flagelos periplasmáticos, anaeróbia, gram negativa de crescimento fastidioso (Alvarez-Ordóñez et al., 2013; Burrough, 2017). Coloniza o intestino grosso, especificamente ceco e colón de suínos, roedores emas e patos (Hampson, 2018). São bactérias hemolíticas em ágar sangue, entretanto apresentam intensidade de hemólise distinta dentro da espécie, considerando que a hemólise representa um marcador de patogenicidade dentro da espécie (Hampson, 2018). Sendo assim, *B. hyodysenteriae*, *B. hamptonii* e *B. suanatina* apresentam forte hemólise, considerados também agentes causadores de DS (Hampson, 2018).

B. pilosicoli agente causador da colite espiroquetar, apresenta fraca hemólise em ágar sangue, infecta suínos, aves e outras espécies incluído humanos, *B. alborgi* apresenta fraca hemólise infecta humanos além de primatas (Hampson, 2018). *B. intermedia* assim como *B. innocens* e *B.*

murdochii apresentam fraca hemólise e infectam suínos e aves, *B. alvinipulli* infecta aves e demonstra fraca hemólise em ágar sangue (Hampson, 2018).

O genoma de *B. hyodysenteriae* é constituído por cerca de 3 milhões de pares de bases, a cepa WA1 foi o primeiro representante do género *Brachyspira* a ser sequenciado. Contendo 2122 sequencias codificadoras de proteínas, dessas 1387 proteínas tiveram sua aplicação determinada (Bellgard et al., 2009). Genes de proteínas que conferem patogenicidade ao agente como, hemolisinas, fosfolipases e motilidade se mostram bem conservados entre estirpes da mesma espécie, assim como genes que codificam proteínas de reconhecimento e ligação a cromatina e digestão das células do hospedeiro (Black et al., 2015).

Entre os genes associados a proteínas com funções determinadas, existem onze genes decodificadores de aspectos estruturais de um agente de transferências de DNA profagos-like (GTA), denominado VSH-1 (vírus *Serpulina hyodysenteriae*-1), capaz de transferir porções aleatórias do material genético bacteriano entre cepas da mesma espécie, estimulados na presença de antimicrobianos ou espécies reativas de oxigênio (Humphrey et al., 1997; Stanton et al., 2008; Motro et al., 2009).

Estudos apontam a existência de um plasmídeo com 36 mil pares de base que atribui virulência a *B. hyodysenteriae* (Bellgard et al., 2009). O que corrobora com o estudo conduzidos por La et al., (2011) que verificaram menor sintomatologia clínica e lesões microscópicas em leitões experimentalmente inoculados com uma estirpe australiana de *B. hyodysenteriae* que não continha esse plasmídeo.

4.3. Epidemiologia da DS

A DS apresenta distribuição mundial, representando um grande problema para países produtores de suínos (Burrough, 2017). A implementação de medidas de biossegurança e boas práticas de manejo em granjas comerciais gerou queda no aparecimento de casos da doença na década de 90 (Hampson, 2012). Entretanto, com decorrer dos anos, vem sendo observada reemergência nos casos de DS, o que pode estar relacionado ao aumento de resistência antimicrobiana e surgimento de novas espécies (Schwartz 2012; Chander et al., 2012; Mirajkar e Gebhart, 2014).

A transmissão de *B. hyodysenteriae* ocorre por via oral, através da ingestão de fezes contaminadas, o período de incubação gira em torno de 10 a 14 dias (Hampson e Burrough, 2019). Roedores representam os principais vetores da doença, contudo insetos e aves também contribuem na disseminação da doença (Hampson et al., 1991; Martinez-Lobo et al., 2013; Rubin et al., 2013).

De acordo com Phillips et al. (2009) aves migratórias representam relevante via de disseminação entre granjas além de propiciar mutações entre cepas.

No Brasil, de acordo com Barcellos et al. (2003), a prevalência de DS no Rio Grande do Sul gira em torno de 31% em granjas que não fazem utilização de antimicrobianos na alimentação. Em estudos de prevalência conduzidos no Espírito Santo, Mato Grosso e Minas Gerais não foi detectada a presença de *B. hyodysenteriae*, o que pode ser atribuído ao emprego de antimicrobianos na dieta (Viott et al., 2013; Oliveira et al., 2016). A região sul, seguida pela região sudeste são as que detêm a maior porcentagem da produção de suínos no Brasil (ABPA, 2020) e, justamente, vem aumentando o número de relatos de DS com ocorrência de surtos nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso (Sato et al, 2015). Além de alguns focos relatados nos estados de Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Distrito Federal entre os anos de 2013 a 2020 (informação pessoal, Roberto Guedes).

4.4. Patogenia

Fatores que conferem patogenicidade ao agente, permitindo a colonização intestinal, incluem quimiotaxia, motilidade e atividade hemolítica (Quintana-Hayashi et al., 2015). A bactéria exerce influência sobre o citoesqueleto de enterócitos, elevando o número de células caliciformes, e com isso, causando aumento na secreção de muco, ocasionado também pelo aumento na expressão dos genes *MUC2* e *MUC5AC*, além da redução na expressão das proteínas transportadoras de membrana e dano aos canais transportadores de membrana (Quintana-Hayashi et al., 2015; Enns et al., 2019). O muco por sua vez, favorece a colonização bacteriana, pois facilita sua mobilidade e penetração nas criptas intestinais, fornece proteção contra o trânsito intestinal e reduz a tensão de oxigênio e a ligação ao ferro (Quintana-Hayashi et al., 2015; Enns et al., 2019).

A diarreia presente na DS ocorre por má absorção de eletrólitos, sódio e cloreto, decorrente de falhas nos processos de transporte de membrana, e destruição epitelial (Argenzio et al., 1980; Enns et al., 2019). Desse modo, a cronicidade da doença resulta em menores concentrações séricas de bicarbonato e elevação nos níveis plasmáticos de potássio, o que pode ocasionar quadros de acidose metabólica e hipercalemia (Argenzio, et al., 1980; Hampson, 2012). Com o estabelecimento da doença ocorre necrose superficial do epitélio intestinal associada à lesão endotelial gerando colite fibrinonecrose hemorrágica (Glock et al., 1974; Kennedy e Strafuss, 1976; Kubo et al., 1979). A lesão epitelial é atribuída pela produção de hemolisinas pelas bactérias além da liberação de lipooligosacarídeos (LOS), o que resulta na esfoliação do epitélio do intestino grosso exposição da submucosa e marcado processo inflamatório na mucosa e submucosa predominantemente neutrofílico colaborando para o estabelecimento de infecções bacterianas secundárias, ou mesmo pelo protozoário *Balantidium coli* com agravamento do quadro clínico (Glock et al., 1974; Kennedy e Strafuss, 1976; Kubo et al., 1979; Hampson, 2012).

Os mecanismos relacionados à patogenia da DS ainda são pouco conhecidos, acredita-se que a infecção pela bactéria interfira na permeabilidade celular, e na resposta inflamatória produzida pelo hospedeiro. Todavia, são necessários novos estudos, que esclareçam com detalhes os processos envolvidos na ocorrência de lesões geradas pela bactéria (Hampson, 2012).

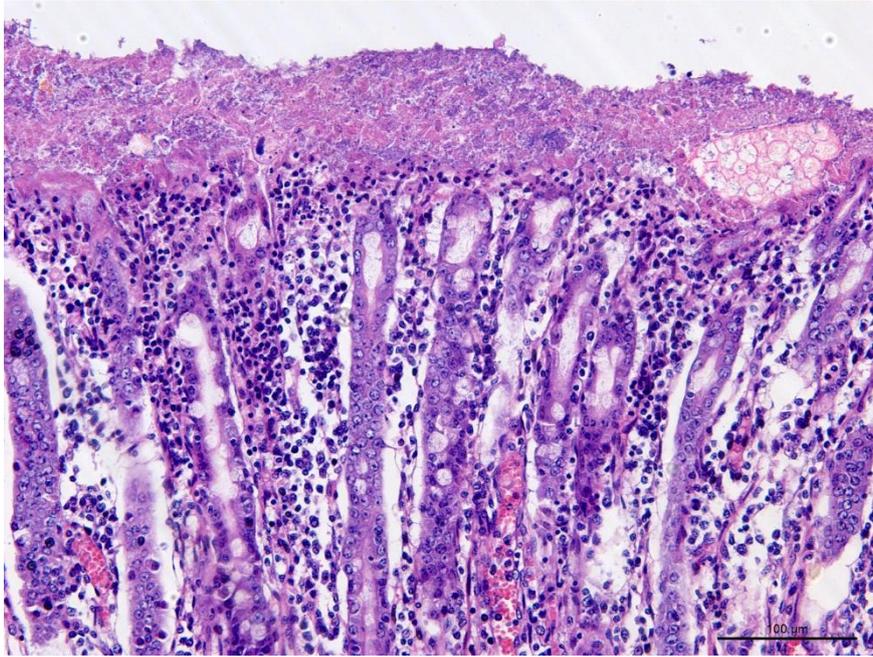
4.5 Patologia

As lesões macroscópicas observadas na DS são vistas restritas ao intestino grosso, caracterizadas por edema de mesocólon, hiperemia e áreas de hemorragias na serosa do intestino grosso. Na mucosa do intestino grosso inicialmente é observado espessamento e hiperemia (Fig. 2a), progredindo para necrose, e hemorragia da mucosa intestinal com formação de membrana diftérica (Fig. 2b 2c). A microscopia revela aumento no número de células caliciformes, infiltrado inflamatório na lâmina própria, necrose superficial do epitélio, formação de pseudomembrana aderida ao epitélio necrótico, com acúmulo de eritrócitos, fibrina, muco, restos celulares e infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico (Figs. 3 e 4). Adicionalmente, é observada intensa hiperemia e edema, em alguns casos podem ser visualizadas estruturas basofílicas espiraladas, compatíveis com colônias bacterianas intralesionais (Wilcock e Olander, 1979; Argenzio, et al., 1980).



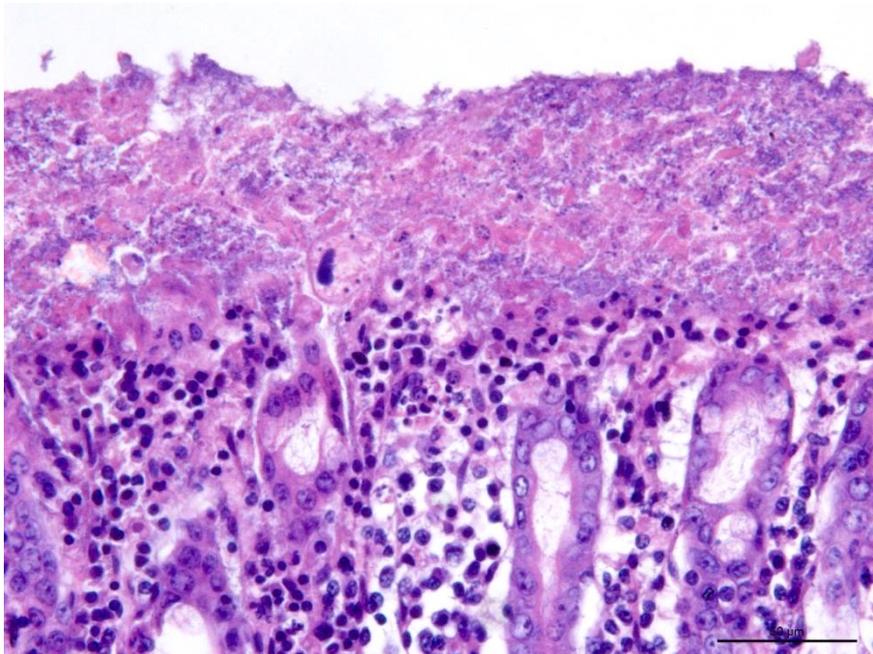
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2. Secções de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*. A) Colite multifocal a coalescente moderada B) Colite necrótica difusa acentuada C) Colite necrohemorrágica multifocal a coalescente acentuada.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3. Microscopia de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*. Observa-se extensa área de necrose superficial do epitélio intestinal associado a infiltrado inflamatório, fibrina e restos celulares. HE 200x.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4. Microscopia de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*. Observa-se necrose superficial, acúmulo de fibrina associado a restos celulares e colônias bacterianas intralésionais. HE 400x.

4.6 Fatores de virulência *B. hyodysenteriae*

Dentre os fatores de virulência relacionados à *B. hyodysenteriae*, a resistência ao oxigênio atribuída pela presença da enzima NADH oxidase, é de extrema importância para sobrevivência no ambiente e colonização no intestino grosso, tendo em vista que nos primeiros estágios da doença a bactéria é exposta a grande tensão de oxigênio e posteriormente é continuamente exposta ao oxigênio devido a lesão causada aos eritrócitos através das hemolisinas (Stanton et al., 1999). A enzima NADH oxidase é codificada pelo gene NADH oxidase (*nox*). Estudos demonstraram que cepas de *B. hyodysenteriae* com gene *nox* inativado apresentaram maior dificuldade para colonização do intestino grosso (Stanton et al., 1999).

As alterações iniciais observadas na DS estão relacionadas a atividade hemolítica bacteriana, em contato com a mucosa intestinal as hemolisinas apresentam efeito citotóxico, juntamente com os lipooligossacarídeos LOS, proteínas externas de membrana que apresentam efeitos tóxicos ao epitélio intestinal (Halter e Joens, 1988; Nibbelink et al., 1997). Dentre os genes que conferem patogenicidade a *B. hyodysenteriae* estão *tlyA*, *tlyB*, *tlyC* e *hlyA*, codificadores de hemolisinas, considerados fatores determinantes de virulência a bactéria (Huurneet al., 1994; Hsu et al., 2001; Belgard et al., 2009; Black et al., 2015), tendo em vista que cepas mutantes com ausência de hemolisinas apresentavam capacidade reduzida no estabelecimento de lesão intestinal (Hyatt et al., 1994).

Durante a DS ocorre redução na expressão de canais iônicos, fator que contribui para alteração no ambiente intestinal, provocando a desorganização e espessamento do muco presente no colón, favorecendo a adesão bacteriana que, juntamente com a elevação no número de células calciformes devido a alterações no citoesqueleto celular e aumento na expressão dos genes MUC2 e MUC5AC, favorece a colonização pelas espiroquetas, conseqüentemente o estabelecimento da doença (Quintana-Hayashi et al., 2015; Enns et al., 2019). A partir destes mecanismos, considera-se que a diarreia presente na DS ocorre por má absorção de eletrólitos, sódio e cloreto, decorrente de falhas nos processos de transporte de membrana, e destruição epitelial (Argenzio, et al., 1980; Hampson, 2012; Quintana-Hayashi et al., 2015; Enns et al., 2019).

Outro fator determinante para patogenicidade de *B. hyodysenteriae* é a quimiotaxia às mucinas intestinais. De acordo com Milner e Sellwood (1994) as espiroquetas possuem um sistema sensorial que determina mudança de sentido em direção ao muco, cepas mais virulentas apresentam quimiotaxia mais apurada em detrimento a estirpes de baixa virulência.

O agrupamento de genes *bit ABC* contribui para ligação bacteriana ao ferro colaborando para sua sobrevivência no ambiente colônico (La et al., 2016).

4.7 Diagnóstico de DS

Para o diagnóstico de DS é importante que seja feita associação entre o histórico clínico das granjas como presença de diarreia mucohemorrágica, aplicação de antimicrobianos ou outros aditivos a ração, com técnicas de isolamento, moleculares, histológicas e hibridização *in situ* (La et al., 2003; Calderaro et al., 2005; Burrough, 2017).

O cultivo bacteriano apesar de complexo, levando em conta que a *B. hyodysenteriae* apresenta crescimento fastidioso e necessita de atmosfera anaeróbica para sobrevivência, é considerado padrão ouro para o diagnóstico de DS. Pode-se lançar mão de técnicas moleculares como amplificação da cadeia de polimerase PCR, utilizando DNA obtido a partir de amostras de fezes, optando pela técnica convencional e leitura em gel de agarose com brometo de etídio (La et al., 2003) ou qRTPCR (Song e Hampson, 2009). Também pode ser empregada uma técnica de PCR em tempo real multiplex capaz de identificar diversas espécies de *Brachyspira* simultaneamente (Borgström et al., 2017).

A aplicação de técnicas imunológicas para o diagnóstico de DS é complicada, tendo em vista a vasta diversidade dos sorogrupos e reatividade cruzada entre espécies (Herbst et al., 2017). Entretanto, estudos demonstraram sucesso no desenvolvimento de testes de imunoadsorção enzimática (ELISA) no intuito de determinar o soroperfil de granjas, quanto a exposição ao agente. No entanto, é difícil precisar quanto a eficácia do teste em sorogrupos distintos dos testados (Song et al., 2015; Hampson et al., 2016).

4.8. Controle e Tratamento da DS Através de Antimicrobianos

Para o controle da DS a utilização de antimicrobianos em pulsos com desinfecção e vazios sanitários nos rebanhos são as metodologias comumente utilizadas. No entanto, tem sido observado um aumento da ocorrência de resistência antimicrobiana ao longo do tempo (Mahu et al., 2017; De Luca et al., 2018). Esse fato demonstra a necessidade de novas alternativas para a prevenção e controle da doença nas granjas, além da grande pressão internacional para a redução do uso de antimicrobianos na produção animal (Mahu, et al., 2017).

Ao longo dos anos, torna-se maior a discussão sobre o impacto causado na saúde humana pelo uso de antimicrobianos na produção animal. Estudos demonstram (Van Den Bogaard et al., 2000; Schwarz et al., 2001; Costa et al., 2008; Omonijo et al., 2018; Cheng et al., 2020) que a utilização de antimicrobianos na alimentação animal, como melhoradores de desempenho, ou para o controle de doenças, podem propiciar a transferência de genes que conferem resistência antimicrobiana, elevando o risco de exposição e infecção (Van Den Bogaard et al., 2000; Schwarz et al., 2001; Costa et al., 2008; Omonijo et al., 2018; ANVISA, 2018; Cheng et al., 2020). Tendo isso em vista, foi criado em 2003 o Regulamento da Comissão Europeia (CE) 1831/2003 do

Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2003 que restringe partir de 2006 o uso de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal na Europa, seguido pelos Estados Unidos que também estabeleceram restrições ao uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho em dezembro de 2016 (Omonijo et al., 2018).

No Brasil, em 2006, foi estabelecida a Instrução Normativa 65, que regulamenta a fabricação e o emprego de rações, suplementos, premix, núcleo ou concentrados com medicamentos para os animais de produção, instituindo que somente medicamentos licenciados pelo MAPA podem ser incorporados a alimentação animal, e os medicamentos de uso veterinários devem ser comercializados somente mediante a prescrição do médico veterinário para produtores e protetores da causa animal.

Com intuito de prevenir a resistência aos antimicrobianos na agropecuária foi instituída em 2017 a Instrução Normativa 41, que instaura o conceito de saúde única, que determina a interdependência da saúde humana, animal e ambiental mediante às atividades de educação, vigilância e defesa agropecuária. Em 2018, foi estabelecido através da Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018, a restrição do emprego antimicrobianos na alimentação de animais de produção, como aditivos melhoradores do desempenho.

Desse modo, os antimicrobianos são considerados importantes ferramentas no controle e prevenção de doenças de rebanho. Entretanto sabe-se hoje, que o uso indiscriminado favorece a ocorrência de resistência cruzada contra microrganismos presentes no corpo humano, reduzindo a efetividade dos fármacos, limitando sua capacidade no controle de doenças (Omonijo et al., 2018; ANVISA, 2018). Dessa maneira, são necessários novos estudos que desenvolvam propostas, que auxiliem a produção de alimentos de origem animal, inserindo substâncias seguras que contribuam com a promoção da saúde dos rebanhos. Os nutracêuticos representam uma alternativa promissora para prevenção e tratamento de doenças na produção animal, livre da aplicação de antimicrobianos (Omonijo et al., 2018).

4.9. Nutracêuticos

Os nutracêuticos podem ser classificados como fibras dietéticas, proteínas, peptídeos, aminoácidos ou cetoácidos, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, minerais, antioxidantes e óleos essenciais (Barbosa et al., 2009). Em alguns trabalhos foi demonstrada que a utilização de óleos essenciais na alimentação animal promoveu aumento nas secreções digestivas, como amilase salivar, ácidos gástricos, biliares, lipase e proteases pancreáticas, e forneceram efeitos protetivos ao epitélio digestivo como aumento da motilidade intestinal (Ohara et al., 1988; Katschinski, 2000; Platel e Srinivasan, 2000; Teff, 2000; Akiba et al., 2002; Hiraoka et al., 2003; Laugerette et al., 2005).

As propriedades fisiológicas atribuídas as fibras dietéticas estão geralmente relacionadas a suas características físicas e solubilidade. Podem ser atribuídos efeitos gastrointestinais como distensão gástrica, influência na taxa de esvaziamento gástrico, volume de fezes, umidade da digesta, aumento na taxa de fermentação no cólon, além de exercer influência sobre a microbiota intestinal (Jalili et al., 2000; Wilfart et al., 2007).

Diversas moléculas de fibras estão sujeitas a diferentes níveis de fermentação bacteriana no cólon, modulando a microbiota intestinal, favorecendo populações de bactérias específicas, de acordo com a origem da fibra e taxa de fermentação fornecida pelas mesmas (Jalili et al., 2000). Derivados como pectina, mucilagens e outros podem ser quase completamente fermentados, enquanto celulose e hemicelulose são apenas parcialmente degradadas e a lignina praticamente não sofre fermentação (Jalili et al., 2000).

O produto da fermentação bacteriana das fibras dietéticas são os ácidos graxos voláteis, ácido acético, butirato e propionato que podem ser oxidados para produção de ATP pelas células epiteliais do cólon. Outros gases produzidos com o aumento da fermentação bacteriana a partir de fibras no cólon são, os gases hidrogênio, dióxido de carbono e metano (Jalili et al., 2000; Wilfart et al., 2007).

A retenção de água representa uma das principais propriedades físicas conferida as fibras, a habilidade para absorção da água está associada a presença de resíduos de açúcar que possuem grupos polares livres, por exemplo (OH, COOH, SO). Através desses grupamentos polares são construídas ligações de hidrogênio com moléculas de água adjacentes (Jalili et al., 2000).

As substâncias relacionadas a fibras dietéticas com maior capacidade de armazenamento de água são pectina, mucilagens e hemicelulose. A celulose e a lignina também podem reter água, contudo, não na extensão de outras fibras. Geralmente as fibras solúveis são mais fermentáveis, com isso, a água armazenada por elas é liberada e absorvida no cólon. Portanto, são as fibras insolúveis que retêm a água por toda a extensão do trato intestinal conferindo maior teor de água a digesta (Jalili et al., 2000).

Os antioxidantes têm sido amplamente utilizados como aditivos alimentares, pois fornecem proteção contra a degradação oxidativa por radicais livres. A atividade antioxidante do órgão tem sido reconhecida em diversos estudos, e se deve principalmente a dois compostos contidos nele Carvacrol e Timol. Ambos lesam a parede ou membrana celular bacteriana, gerando influxo de líquido para seu interior, degradação de proteínas plasmáticas e colapso da membrana bacteriana (Cervato et al., 2000; Abdalla e Roozen, 2001; Damechki et al., 2001; Martinez-Tomé et al., 2001; Bendini et al., 2002; Omonijo et al., 2018).

Tanto Carvacrol quanto Timol, além de outros derivados de óleos essenciais, apresentam ação inibitória contra *B. hyodysenteriae*, contudo, para inibição do crescimento da bactéria, esses compostos devem atingir uma concentração inibitória mínima (MIC). A concentração inibitória mínima varia, entre microrganismo, cepa, ou mesmo óleos essenciais distintos (Omonijo *et al.*, 2018).

A atividade antimicrobiana e de modulação da microbiota intestinal, exercida pelos nutracêuticos, representa uma alternativa para melhorar o desempenho animal. Na literatura é possível encontrar diversas referências que fornecem evidências da atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de diversos extratos contra patógenos de origem alimentar (Larrondo *et al.*, 1995; Basílico e Basílico, 1999; Dorman e Decanos, 2000; Rota *et al.*, 2004; Omonijo *et al.*, 2018). Contudo, as informações disponíveis sobre mecanismos pelos quais os nutracêuticos agem no organismo são insipientes. Assim sendo, são necessários novos estudos que descrevam com detalhes quais as formas de atuação de nutracêuticos no organismo dos suínos.

Este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos preventivos e terapêuticos de nutracêuticos a base de fibras insolúveis, quanto ao estresse oxidativo durante a patogênese da DS, a partir da mensuração das concentrações de enzimas antioxidantes e substâncias resultantes do estresse oxidativo sobre a mucosa intestinal. Assim como, a avaliação da permeabilidade intestinal através da recuperação sérica de Fitc Dextran.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG em reunião “*online*” do dia 08/06/2020 com número de protocolo 80/2020.

5.1 Animais e Delineamento Experimental

Para realização do experimento foram utilizados 40 leitões de 21 dias de idade, provenientes de granja núcleo, sem histórico clínico de infecções por *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis* ou *Salmonella* sp. Os animais foram randomizados e separados em quatro grupos, sendo esses: controle negativo, não inoculados com *B. hyodysenteriae* e não suplementados com aditivo nutracêutico (CN) (n=10); grupo suplementado com nutracêutico 7 dias antes da inoculação com *B. hyodysenteriae* (NAI) (n=10); grupo suplementado com nutracêutico após a inoculação com *B. hyodysenteriae* (NPI) (n=10); e controle positivo, inoculados com *B. hyodysenteriae* e não suplementados com nutracêutico (CP) (n=10). Os animais foram alojados em oito baias (5 animais por baia), em quatro salas diferentes, sendo duas baias por sala. Estritas medidas de biossegurança foram adotadas para limpeza e tratamento dos animais, com equipes diferentes entre os grupos inoculados e o grupo controle negativo. Todos os leitões foram aclimatados as

instalações por 7 dias, recebendo ração e água *ad libitum*. Sete dias antes da inoculação, animais do grupo NAI começaram a receber ração suplementada com nutracêutico na proporção de 1,5 Kg por tonelada de ração, até o fim do experimento. No dia 0 do experimento, 14 dias após chegada, os animais dos grupos NAI, NPI e CP foram desafiados, por via intra-gástrica utilizando gavage flexível, por três dias consecutivos com 50 ml do inóculo contendo, em média $5,31 \times 10^8$ organismos de *B. hyodysenteriae*/ml por dia. Os animais do grupo controle negativo receberam igual volume de caldo Brain Heart Infusion (BHI) estéril. Os animais do grupo NPI receberam ração suplementada com nutracêutico a partir de 3º dia após a primeira inoculação, até o fim do experimento. Os animais dos grupos CP e CN receberam ração livre de nutracêutico durante todo período experimental.

Após a inoculação os animais foram observados e avaliados diariamente quanto a consistência fecal, que foi classificada em escores, onde 0 = normal, 1 = consistência semi-sólida, 2 = pastosa e 3 = líquida, com adição de 0,5 para a presença de muco perceptível e/ou sangue, de acordo descrito por Rubin et al. (2013). Animais clinicamente debilitados foram eutanasiados durante o experimento para preservá-los de sofrimento, como estabelecido pelo CEUA. Amostras de fezes foram coletadas 5 dias antes da inoculação e 3, 6, 9, 12 e 13 dias após a primeira inoculação (dpi) para realização de qPCR para *B. hyodysenteriae* (La et al, 2003). Tentativa de isolamento bacteriano anaeróbico para *B. hyodysenteriae* (Leser et al., 1997) foi realizado em amostras de fezes obtidas no dia da necropsia.

Seis dias após a primeira inoculação, todos os leitões receberam, via oral, solução de FITC Dextran (1ml) e, após 6h, o sangue foi coletado, centrifugado a 3.780g para obtenção do soro. Em seguida, as amostras de soro foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

Quatorze dias após a primeira inoculação, todos os animais foram eutanasiados e necropsiados segundo critérios estabelecidos pelo CEUA. Durante o experimento não foi empregado nenhum tipo de antimicrobianos ou compostos que pudesse interferir no resultado do estudo. As atividades foram executadas com máxima biossegurança.

5.2 Preparação do Inóculo

A cepa patogênica de *B. hyodysenteriae*, utilizada para preparação do inóculo, foi obtida em 2013 de um suíno que apresentava quadro clínico grave de DS, proveniente de granja localizada no estado de Minas Gerais. O cultivo foi realizado de acordo com o descrito por Leser et al. (1997). Brevemente, a cepa patogênica de *B. hyodysenteriae* foi semeada em Agar tripticase de soja

(TSA) suplementado com 5% de sangue equino sob atmosfera anaeróbica (N₂ 80%, CO₂ 10% e H₂ 10%), à 37°C durante três dias. Em seguida, as placas de Agar TSA foram lavadas com PBS estéril. O PBS adquirido com o lavado das placas foi incubado em caldo de crescimento Brain Heart Infusion (BHI), enriquecido 10% de soro fetal bovino, 0,2% NaHCO₃, adaptado de (Kunkle et al., 1986) na proporção de 1:100 ml (lavado:caldo), por 21 horas, à 39°C em estufa shaker, e, posteriormente, foi realizada a inoculação dos animais.

5.3 Dieta

Todos os animais receberam ração balanceada, a base de milho e farelo de soja, atendendo as demandas metabólicas para sua faixa etária (Rostagno et al, 2005), durante todo o período experimental. Os animais dos grupos tratados com nutracêuticos receberam a mesma ração suplementada com nutracêutico, a base de fibras insolúveis e orégano, na proporção de 1,5kg por tonelada de ração.

5.4 Isolamento Bacteriano

Para o isolamento de *Brachyspira* sp., foram utilizadas somente amostras de fezes coletadas no dia da eutanásia dos animais, 13 dpi. As amostras de fezes foram difundidas em meio seletivo ágar TSA Tryptic Soy Agar (Tryptic Soy Agar, DIFCO, cat n°211043), suplementado com 5% sangue equino, 6,25 mg/µl rinfampicina (Rifampicin, Sigma-Aldrich, cat n° R3501), 800 mg/µl de espectinomicina (Spectinomycin, Sigma-Aldrich, cat n° S9007), 25 mg/µl de vancomicina (Vancomycin, Sigma-Aldrich, cat n° V2002), 25 mg/µl de colistina (Colistin, Sigma-Aldrich, cat n° C1511) (Leser et al., 1997), e foram incubadas por três dias, a 42°C, em jarras com meio anaeróbico, preenchidas com mistura dos gases N₂(80%), CO₂(10%) e H₂(10%). O ambiente anaeróbico foi confirmado por fita indicadora de anaerobiose (Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher, cat n° BR0055). Os isolados foram submetidos a técnica de esgotamento em placa com meio seletivo para obtenção de colônias puras, e, posteriormente, foram acondicionados em freezers a -80°C.

5.5 qPCR

Para os testes moleculares foram utilizados kits de extração de DNA (QIAamp®Fast DNA Stool Mini Kit). As análises de qPCR foram realizadas em duplicata, usando primers para o gene *Nox* de *B. hyodysenteriae* SYBER assay, JH0073 (5'-AGT GAA ATA GTT GCT CAT ATC AAA - 3') JH0074 (5'-GCA TCA CTG ATT AAA GAA CCA ATT-3'), de acordo com limite de detecção 10⁴-10⁹ cópias por gramas de fezes (Rubin et al. 2013). Para realização da curva padrão, foi utilizada 1g de fezes sabidamente negativa para *B. hyodysenteriae* e adicionado uma quantidade conhecida de *B. hyodysenteriae*. O volume final da reação foi 25µL, constituídos por 1x SYBR Green PCR Master Mix, 1x QN ROX Reference Dye (QuantiNova SYBR Green PCR Kit, Qiagen

Inc., Toronto, ON), 500 nM de cada primer e 5 µL de DNA. As amostras foram pipetadas em placas de 96 poços e amplificadas em termociclador (QuantStudio1®). Todas as reações contaram com controle negativo e controle positivo a partir da curva padrão. As análises foram realizadas pelo software (QuantStudio™ Design & Analysis Software) (Sato, 2017).

5.6 Necropsia

Os animais foram eutanasiados 13 dpi, de acordo as normas exigidas pelo CEUA, em seguida, foram necropsiados e realizada a avaliação macroscópicas dos órgãos. Animais clinicamente debilitados foram eutanasiados no decorrer do experimento em concordância aos critérios estabelecidos pelo CEUA. Durante a necropsia, os animais foram avaliados quanto a presença de lesões macroscópicas no intestino grosso e porção aboral do intestino delgado. Regiões alteradas foram classificadas levando em consideração as seguintes variáveis: espessamento e hiperemia de mucosa, necrose, presença de hemorragia, muco, fibrina e edema, e graduadas de acordo a intensidade da lesão sendo, normal =0, discreto =1, moderado =2, acentuado =3.

Fragmentos de íleo, ceco, colón e linfonodos mesentéricos foram coletados e fixados em formalina tamponada 10% para avaliação microscópica. Além disso, foram coletadas amostras de fezes da ampola retal e raspados da mucosa da porção apical do cólon espiral para análises de isolamento bacteriano e redox, respectivamente.

5.7 Histopatologia

Foram coletadas amostras de íleo para descartar possível quadros relacionados à outros agentes bacterianos, além de fragmentos de intestino grosso, posteriormente as amostras foram desidratados em álcool etílico absoluto, hidratados por xilol e incluídos em parafina para confecção de lâminas, coradas em coloração de hematoxilina e eosina (HE), segundo descrito por Luna (1968). Posteriormente, as preparações foram avaliadas quanto a presença de alterações histopatológicas compatíveis com infecção por *B. hyodysenteriae*. As variáveis avaliadas no exame histopatológico foram as seguintes: 1) presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria, 2) hiperplasia de células caliciformes, 3) necrose superficial, 4) formação de pseudomembrana e 5) aumento de muco. Essas lesões foram avaliadas e graduadas segundo a intensidade, sendo normal = 0; Discreto = 1; Moderado = 2; Acentuado = 3. Posteriormente, foi realizada análise estatística por variável. Um escore composto para lesões histológicas totais por animal foi gerado utilizando pesos por variável avaliada, sendo esses: peso 1 para infiltrado inflamatório e hiperplasia de células caliciformes; peso 2 para presença de muco e formação de pseudomembrana; e peso 3 para necrose superficial do epitélio intestinal. Os animais foram classificados segundo a média ponderada dos pesos e da intensidade das lesões de cada variável analisada, e posteriormente, realizada análise estatística.

5.8 Avaliação de Lesão Oxidativa

As lesões oxidativas foram mensuradas quanto a concentração de Glutathione-S-Transferase, Glutathione reduzida, Superóxido dismutase, Peroxidação lipídica e Proteína tecidual, recuperadas a partir de raspado de mucosa de intestino grosso de todos os leitões, obtidos do ápice do cólon espiral, no dia da eutanásia. As amostras de raspado da mucosa foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, logo após eutanásia, e avaliação macroscópica, até o momento das análises. A determinação da lipooxidação foi realizada através do ensaio de oxidação do Fe²⁺ na presença de xilenol laranja, conhecido como ensaio FOX – Ferrous Oxidation/Xylenol (Jiang et al., 1991). A determinação de Superóxido dismutase foi realizada através de oscilopolarografia de varredura única (Gao et al., 1998). A concentração da proteína tecidual e das enzimas Glutathione reduzida e Glutathione-S-Transferase foram determinadas por ensaio espectrofotométrico (Sedlak e Lindsay, 1968; Habig et al., 1974).

5.9 Análise de Permeabilidade Intestinal

Para avaliação de alterações na permeabilidade e tempo de trânsito intestinal foi mensurada a recuperação de Dextrano sérico dos leitões. Os níveis de FITC-Dextran nas amostras de sangue coletadas 6 dpi foram determinados por medição de fluorescência, através de um comprimento de onda de excitação de 485nm e comprimento de onda de emissão de 528nm com espectrômetro de fluorescência (Vicuña et al., 2015).

5.10 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foram empregados teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn para avaliar parâmetros qualitativos como, diferenças entre os tratamentos quanto ao escore clínico, escore de lesão microscópicas e macroscópica, recuperação de FITC sérico, concentração de Glutathione-S-Transferase, Superóxido dismutase e Lipoperoxidação. Variáveis quantitativas, com distribuição normal, como as concentrações de Glutathione reduzida e Proteína tecidual, foram avaliadas através do teste de ANOVA e teste post-hoc de Tukey. As análises de qPCR foram submetidas a transformações por raiz quadrada e logarítmicas e avaliadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Foram considerados significativos $P \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação Clínica

Durante o experimento foram eliminados dois animais do estudo. Um leitão do grupo NAI que se apresentava clinicamente debilitado, com intensa redução do escore corporal, apatia, desidratação e diarreia líquida mucohemorrágica profusa, sendo eutanasiado no dia 11 dpi, de acordo com critérios estabelecidos pelo CEUA. Outro animal, do grupo CP, veio a óbito em decorrência de laceração da veia jugular durante uma coleta de sangue no dia 6 dpi.

Nenhum animal do grupo CN apresentou diarreia mucohemorrágica em nenhum momento do estudo. As avaliações clínicas apontaram que a manifestação de diarreia líquida e mucohemorrágica iniciaram no 6 dpi no grupo NAI em três animais, incluindo o animal eutanasiado no dia 11 dpi, progredindo para seis animais intensamente diarreicos até 12 dpi, sendo que destes seis, cinco apresentavam diarreia líquida mucohemorrágica. No grupo NPI, 7 dpi, nove animais apresentavam diarreia, sendo um animal com diarreia aquosa e mucohemorrágica, e cinco animais com diarreia líquida profusa. Posteriormente, 12 dpi, seis animais do grupo NPI apresentavam diferentes intensidades de diarreia, sendo dois animais com diarreia aquosa e mucohemorrágica.

No grupo CP, a manifestação de diarreia líquida e mucohemorrágica ocorreu 10 dpi em um animal, evoluindo para sete animais diarreicos no 12 dpi, sendo que três apresentavam diarreia aquosa e mucohemorrágica. Durante as primeiras semanas do estudo alguns animais do grupo CN apresentaram diarreia líquida e foram positivos para *Escherichia coli* enterotoxigênica no isolamento bacteriológico, a partir de amostras de fezes e detecção de gene *stx2-e* pelo teste de PCR multiplex (Macedo et al, 2011).

Não foi observada diferença significativa na comparação entre grupos para cada dia de avaliação clínica de diarreia após a inoculação com *B. hyodysenteriae*.

6.2 Achados Macroscópicos

Nenhum animal do grupo CN apresentou qualquer lesão intestinal. O grupo que exibiu maior grau de lesão macroscópica foi o NAI, seguido pelo CP. Foi observado diferença estatística entre os grupos CN e NAI (Fig. 5). Nos grupos inoculados, CP, NAI e NPI, foram observadas lesões no cólon espiral que variaram de colite catarral difusa intensa (Fig. 6a) à colite necrohemorrágica e fibrinonecrohemorrágica difusas intensas (Fig. 6b e 6c).

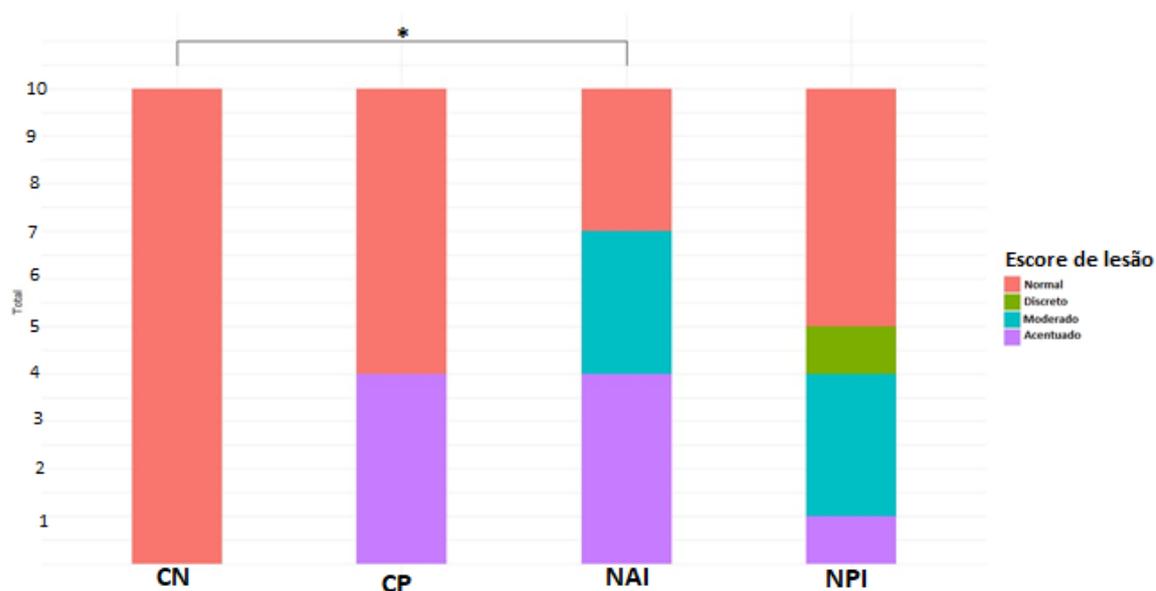
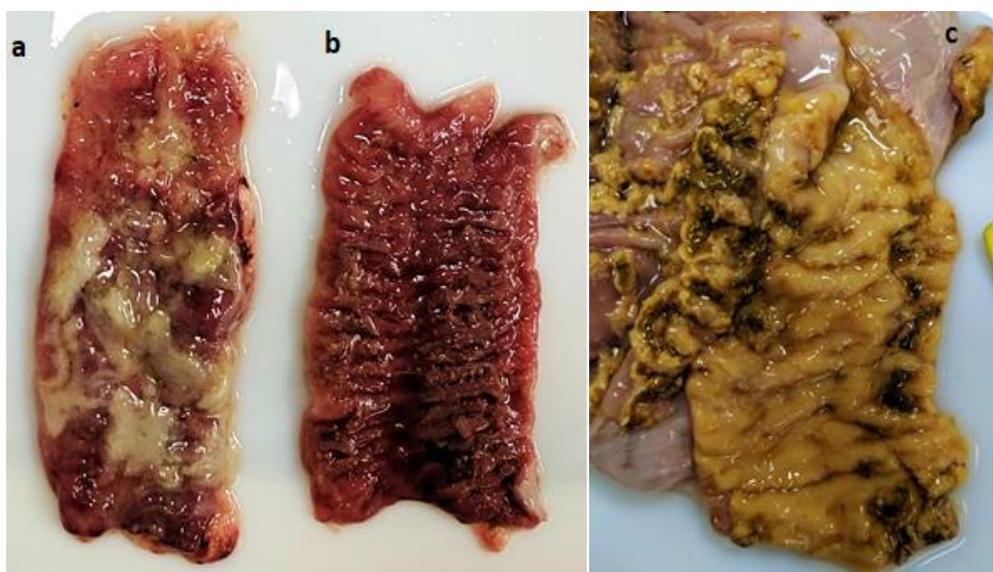


Figura 5. Comparação de score de avaliação macroscópica entre grupos de suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*. Normal =0, discreto =1, moderado =2, acentuado =3. Identificação entre grupos experimentais CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAI: Nutraceuticos antes da inoculação; NPI: nutracêuticos após a inoculação. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. *P< 0,05.



Fonte: Arquivo pessoal

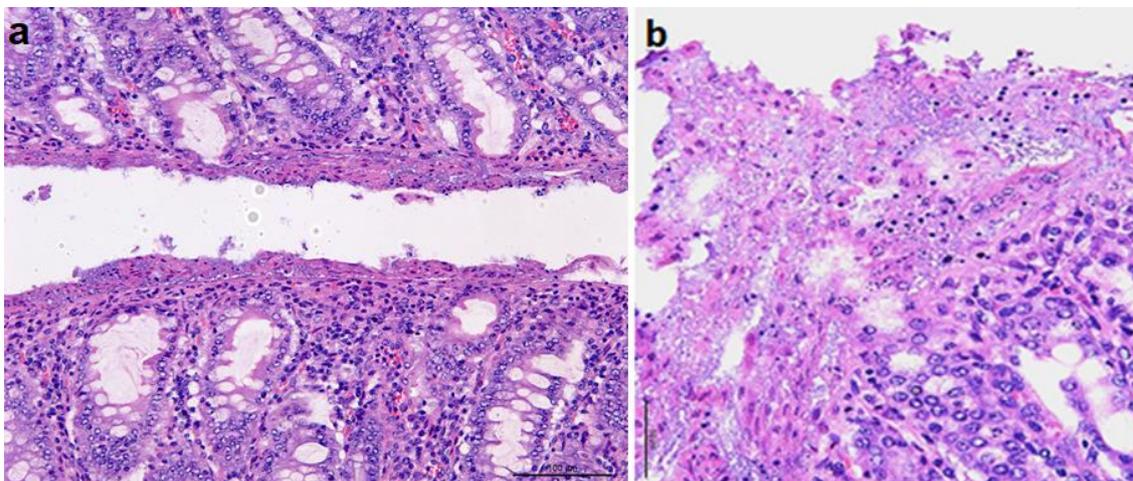
Figura 6. Secções de colón espiral de suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*. a) Colite catarral difusa acentuada, b) Colite necrohemorrágica difusa acentuada, c) Colite fibrinonecrótica difusa intensa.

6.2 Resultados de Lesões Histopatológicas

Na avaliação histopatológica, utilizando o escore composto, foi observado maior número de animais com escore acentuado de lesões microscópicas (Fig. 7) no grupo NPI, seguido pelo NAI (Fig. 8). Foi observada diferença ($P<0,05$) entre o grupo CN e os três grupos inoculados, mas não houve diferença entre os grupos inoculados (Fig. 8).

O grupo com maior número de animais com grau acentuado de hiperplasia de células caliciformes e infiltrado inflamatório foi o NAI. Para essas duas variáveis, foi observada diferença ($P<0,05$) entre o grupo CN e os demais três grupos inoculados, não havendo diferença entre os grupos inoculados (Fig. 9).

As análises referentes a presença de muco e necrose intestinal revelaram maior número de animais com essas alterações severas no grupo NPI, seguida do grupo NAI. Foi encontrada diferença ($P<0,05$) entre o grupo CN e os dois grupos que receberam nutracêutico (NAI e NPI) para ambas as variáveis. Nas análises quanto a formação de membrana pseudodiftérica, os maiores valores foram encontrados no grupo NPI, sendo observada diferença estatística somente entre os grupos CN e NPI (Fig. 9).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7. Microscopia de colón espiral de suínos inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*. A) Extensa área de necrose superficial do epitélio intestinal associado a infiltrado inflamatório na lâmina própria superficial. HE 200x. B) Extensa área de necrose e esfoliação superficial do epitélio intestinal associado a infiltrado inflamatório, fibrina, muco e restos celulares. HE 200x.

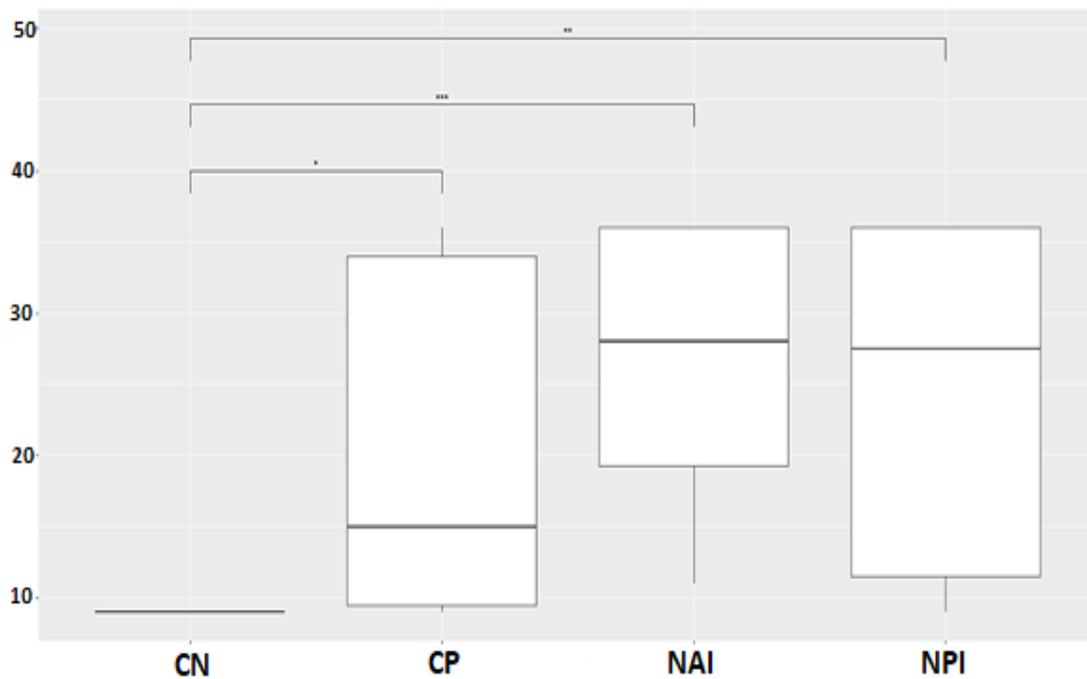


Figura 8. Comparação de escore composto de lesões histopatológicas. Identificação entre grupos experimentais CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAI: Nutraceuticos antes da inoculação; NPI: nutraceuticos após a inoculação. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. * $P < 0,05$ _ ** $P < 0,01$ _ *** $P < 0,001$.

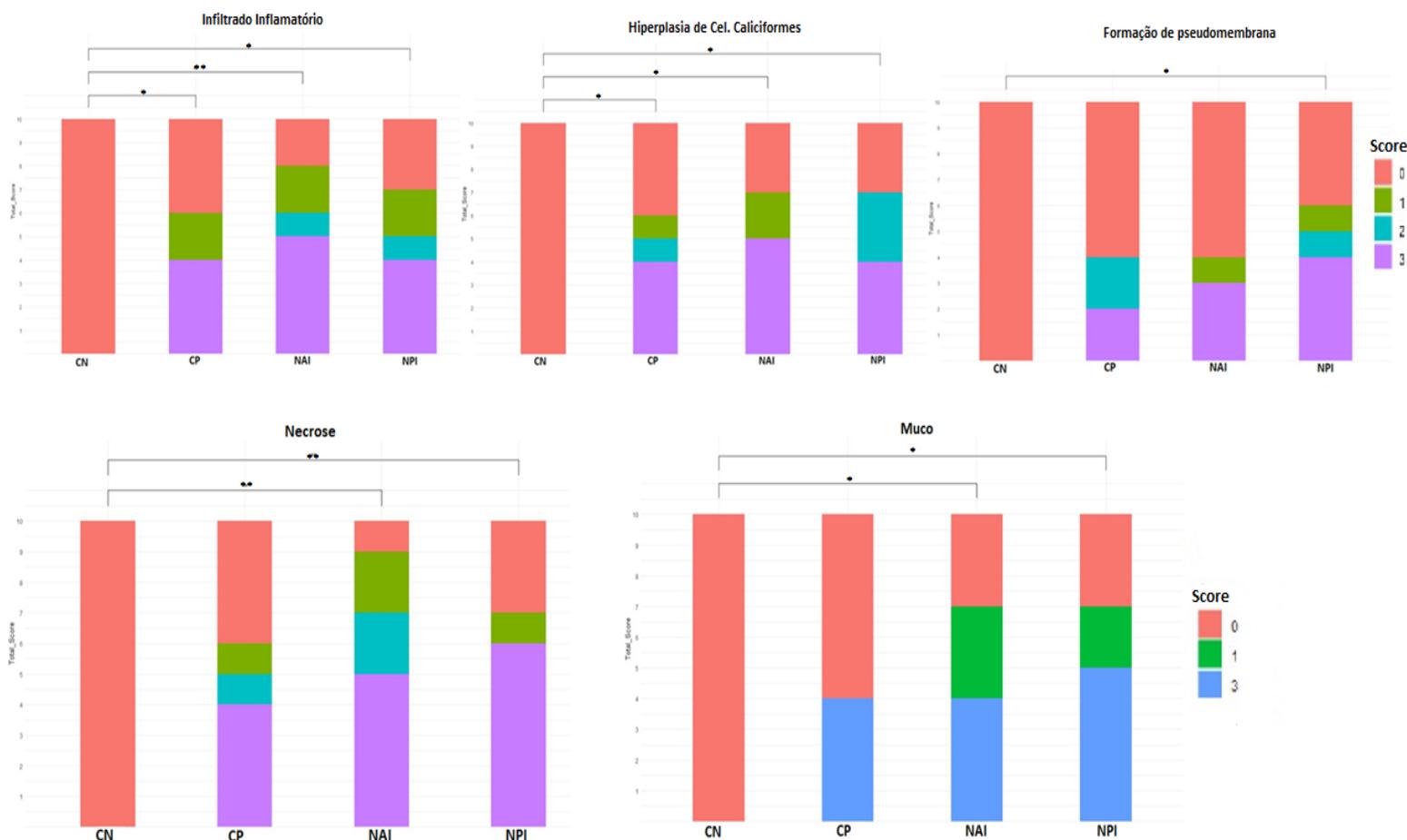


Figura 9. Comparação de escores de lesão histopatológicas isoladas. Identificação entre grupos experimentais CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAI: Nutraceuticos antes da inoculação; NPI: nutraceuticos após a inoculação. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. * $P < 0,05$ _ ** $P < 0,01$.

6.4 Avaliação de qPCR para *B. hyodysenteriae*

Foi realizada avaliação de qPCR a partir de amostras de fezes coletadas em seis momentos distintos dentro do período experimental. Os resultados indicam que na primeira coleta, 5 dias antes da inoculação, nenhum grupo apresentava eliminação do agente (Fig. 10a). A partir da 3ª coleta, 6 dpi, até a 5ª coleta, 12 dpi, o grupo NAI apresentou maior eliminação de *B. hyodysenteriae* nas fezes. Na terceira coleta de fezes, dia 6 dpi, houve diferença significativa entre o grupo NAI e os grupos CN, CP e NPI (Fig. 10c). Na quarta coleta, 9dpi, o grupo NAI teve resultados significativamente superiores de eliminação de bactérias nas fezes do que os grupos CN e CP (Fig. 10d). Na quinta, 12dpi (Fig. 10e), e sexta coletas, 13dpi (Fig. 10f), os grupos CN e NAI e CN e CP apresentaram diferença significativa, respectivamente, com valores superiores para NAI e CP.

A comparação de médias entre grupos, considerando a eliminação total de bactéria, somando todos os períodos, aponta diferença estatística significativa entre o grupo CN e os outros três grupos inoculados, e diferença entre o grupo CP e o NAI, com valores superiores para o último (Tab. 1).

Tabela 1. Comparação da diferença entre medias de qPCR para *B. hyodysenteriae* de cada grupo, considerando o somatório dos resultados de todas as coletas de fezes. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal Wallis. *P< 0,05 _ ****P<0,0001.

.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
eliminacao	C-	C+	60	59	3.076720	0.0020929	0.0125575	*
eliminacao	C-	NAI	60	59	5.850532	0.0000000	0.0000000	****
eliminacao	C-	NPI	60	60	4.382585	0.0000117	0.0000704	****
eliminacao	C+	NAI	59	59	2.762231	0.0057408	0.0344447	*
eliminacao	C+	NPI	59	60	1.287412	0.1979507	1.0000000	ns
eliminacao	NAI	NPI	59	60	-1.486401	0.1371732	0.8230393	ns

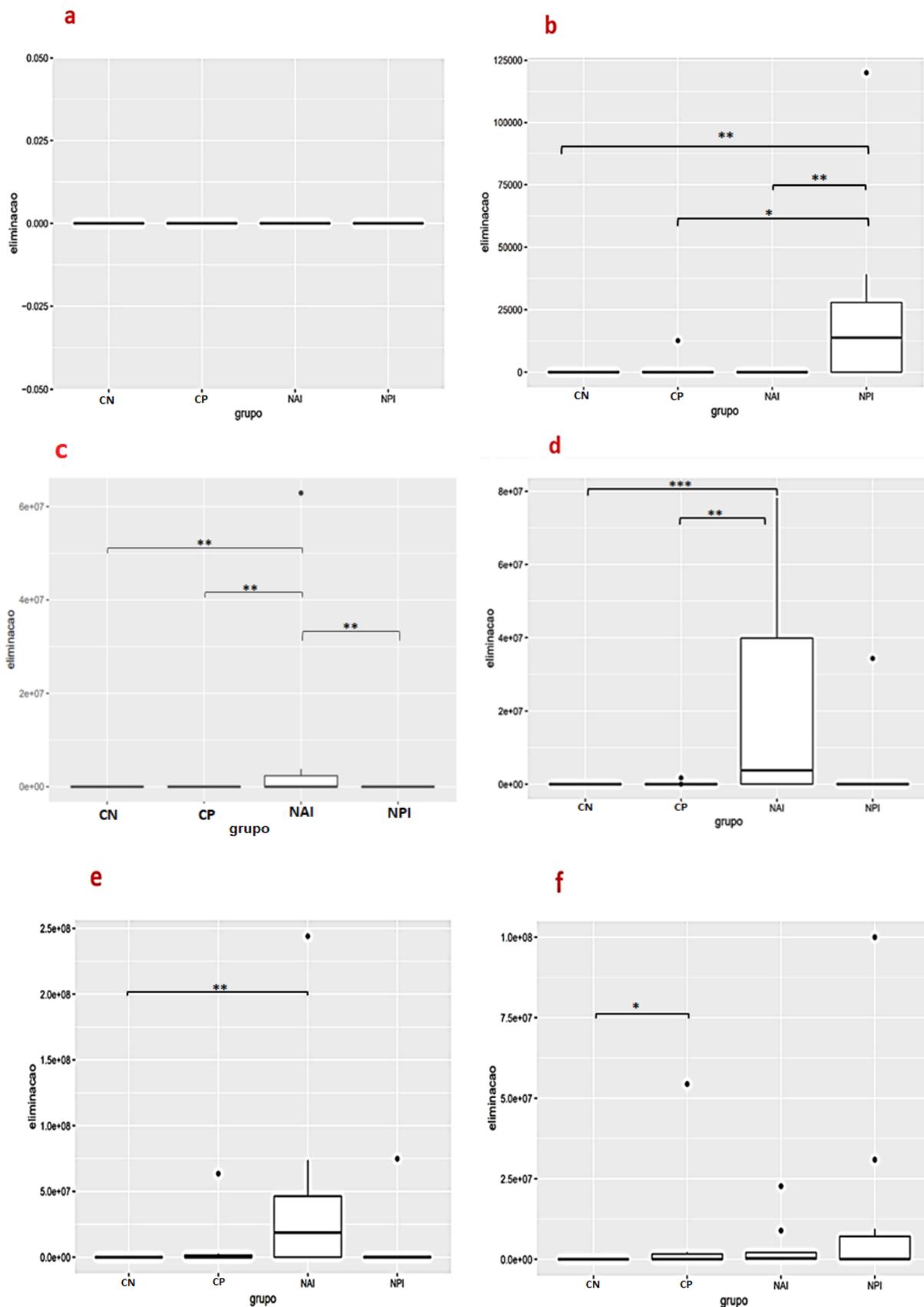


Figura 10. Representação gráfica dos 6 diferentes momentos de coleta de fezes de suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* e tratados ou não com nutracêuticos. **A) -5 dpi; B) 3 dpi; C) 6 dpi; D) 9 dpi; E) 12 dpi; e F) 13 dpi.** Identificação entre grupos experimentais CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAI: Nutraceuticos antes da inoculação; NPI: nutracêuticos após a inoculação. Análise estatística foi realizada utilizando transformação por raiz quadrada e logarítmica e teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. *P< 0,05 _ **P<0,01 _ ***P<0,001.

6.5 Isolamento Bacteriano

O isolamento bacteriano foi realizado a partir de amostras de fezes de todos os animais obtidas no 13 dpi. Foi possível recuperar colônias puras de espiroquetas fortemente hemolíticas a partir de amostras de fezes de 25 suínos, que foram propagadas até a terceira passagem, sendo 8 animais do grupo NAI, 9 animais do grupo NPI e 8 animais do grupo CP. Dessas 25 placas, foi possível realizar o isolamento bacteriano em ágar TSA de 14 culturas que apresentaram forte hemólise por toda estria de esgotamento, sendo 4 do grupo NAI, 6 do grupo NPI e 4 do grupo CP. Não foi isolado nenhuma bactéria compatível com *B. hyodysenteriae* em nenhum dos animais do grupo CN.

6.6 Resultados da Avaliação da Permeabilidade Intestinal

Para avaliação de alterações na permeabilidade e tempo de trânsito intestinal foi mensurada a recuperação de Dextrano sérico dos leitões. Os grupos com maior permeabilidade intestinal foram NPI, seguido do grupo CP, e os menores valores para o grupo NAI, como mostrado na Fig. 11. Foi observada diferença estatística entre o grupo NAI e os dois outros grupos inoculados (Tab. 2).

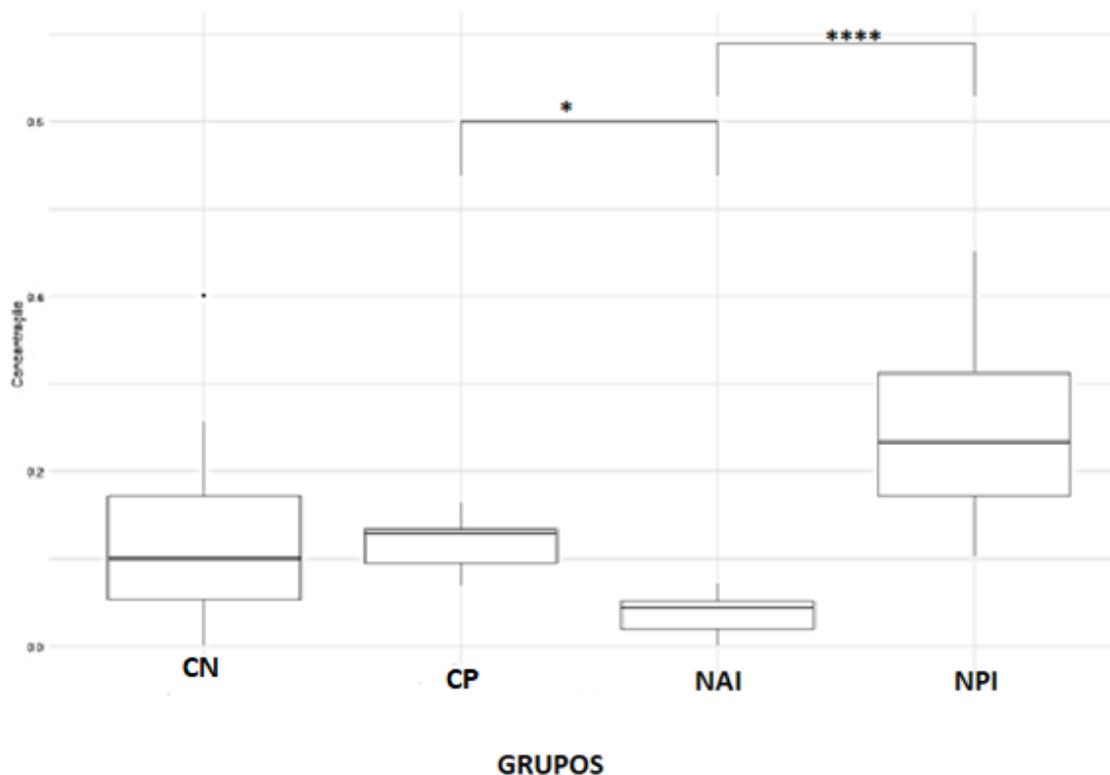


Figura 11. Comparação da recuperação de Dextrano entre grupos de leitões inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* e tratados com nutracêuticos. Identificação entre grupos experimentais CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAI: Nutraceuticos antes da inoculação; NPI: nutracêuticos após a inoculação. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. *P< 0,05 _****P<0,001.

Tabela 2. Comparação da recuperação de Dextrano entre grupos de leitões inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* e tratados com nutracêuticos. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. *P< 0,05 _****P<0,001.

.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
fitc	c-	c+	10	10	0.4303845	0.6669160	1.0000000	ns
fitc	c-	NAI	10	10	-2.2571274	0.0240001	0.1440007	ns
fitc	c-	NPI	10	10	2.4771017	0.0132454	0.0794725	ns
fitc	c+	NAI	10	10	-2.6875119	0.0071987	0.0431919	*
fitc	c+	NPI	10	10	2.0467173	0.0406859	0.2441151	ns
fitc	NAI	NPI	10	10	4.7342292	0.0000022	0.0000132	****

6.7 Resultados das Concentrações de Enzimas Antioxidantes

A avaliação quanto as quantidades de enzimas antioxidantes foram mensuradas através das concentrações de Glutathione-S-Transferase, Glutathione reduzida, Superóxido dismutase, Peroxidação lipídica e proteína tecidual, recuperadas a partir de raspado de mucosa de ápice de cólon espiral de leitões no dia da eutanásia (13 dpi), sendo os resultados demonstrados na Fig. 12.

As concentrações de Glutathione-S-Transferase (GST) foram maiores no grupo CP, seguido pelo grupo CN, sendo observada diferença significativa entre esses dois grupos e os que receberam nutracêutico (NAI e NPI). As concentrações de Superóxido Dismutase foram superiores no grupo CN, seguido pelo grupo NAI, tendo sido observada diferença estatística entre esses dois grupos e o grupo CP. Quanto as concentrações de peroxidação lipídica, os maiores valores foram verificados no grupo CP, sendo observada diferença estatística somente entre esse grupo e o grupo CN. Os resultados referentes a proteína tecidual foram superiores no grupo CP, tendo sido observada diferença estatística entre esse grupo e os grupos CN e NAI. Não houve diferença estatística significativa entre grupos para a variável Glutathione reduzida.

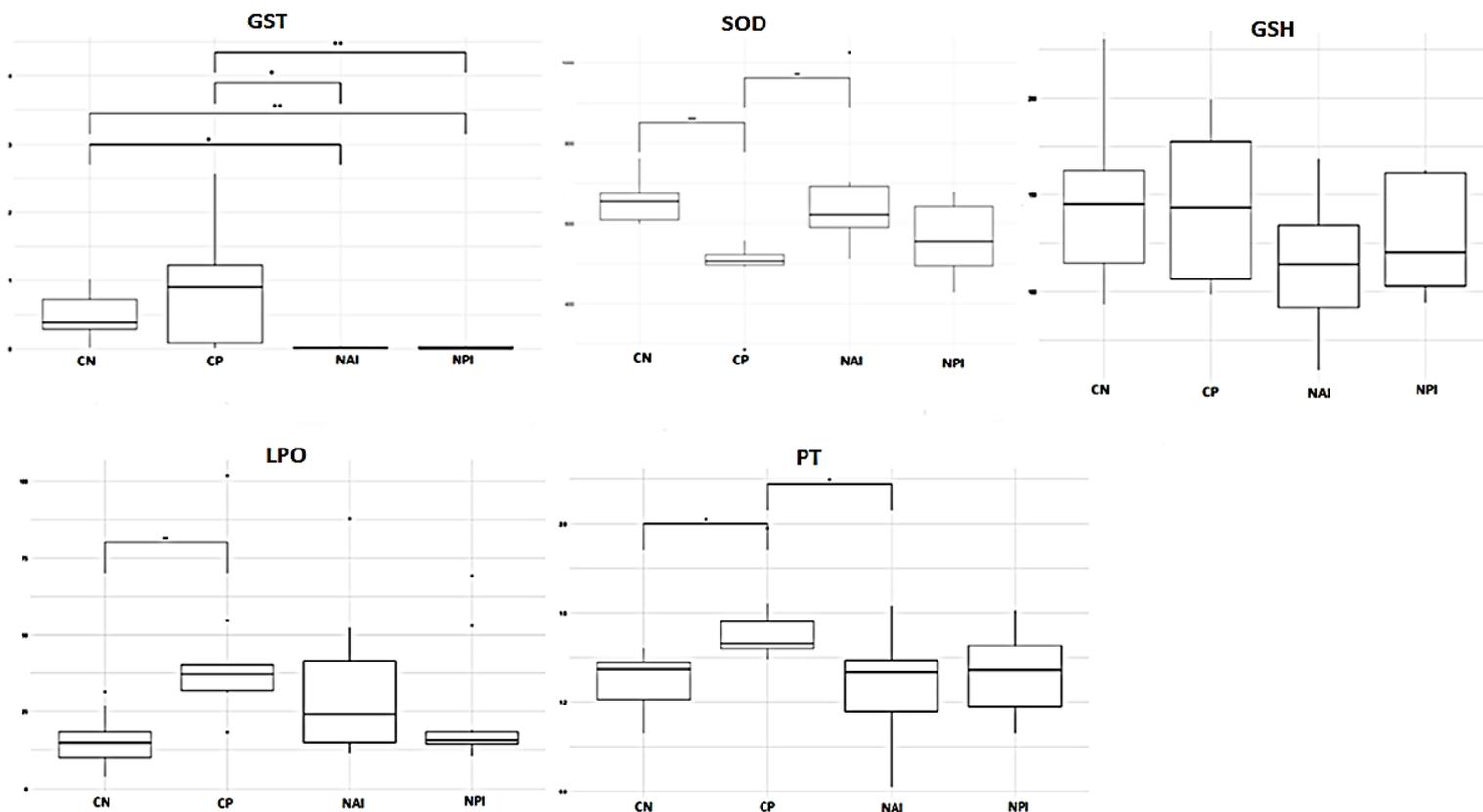


Figura 12. Resultados a análise de quantificação de Glutathione -S- Transferase (GST); Superóxido Dismutase (SOD); Peroxidação lipídica (LPO); Glutathione reduzida (GSH); Proteína tecidual (PT) entre grupos de leitões inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* e tratados com nutracêuticos. Identificação entre grupos experimentais CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAI: Nutraceuticos antes da inoculação; NPI: nutracêuticos após a inoculação. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Para as variáveis GST, SOD, LPO, que apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste ANOVA com ajuste pelo teste de Tukey para GSH e PT. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

7. DISCUSSÃO

Está é a primeira pesquisa que avalia os efeitos preventivos e terapêuticos de nutracêuticos a base de fibras insolúveis frente a infecção experimental com *B. hyodysenteriae* em suínos quanto, ao estresse oxidativo durante a patogênese da DS, além da avaliação da permeabilidade intestinal através da recuperação sérica de Fitc Dextran.

Nenhum animal do grupo CN apresentou alterações macroscópicas e microscópicas sugestivas de DS ou eliminação do agente. Além disso, animais do grupo CP apresentaram quadro clínico sugestivo da doença, além de lesões macro e microscópicas compatíveis com a doença e eliminação de *B. hyodysenteriae* nas fezes. Dessa forma, o modelo experimental foi bem-sucedido não tendo ocorrido contaminação do grupo CN.

Durante o período experimental dois animais foram removidos do estudo sendo, um animal do grupo NAI, eutanasiado no dia 11 dpi devido ao agravamento do seu quadro clínico resultante da

DS, apresentando diarreia aquosa mucohemorrágica profusa, considerável perda de escore corporal e apatia, além de um animal do grupo CP que no dia 6 dpi sofreu laceração da veia jugular durante uma coleta de sangue.

Para uniformizar as análises, a porção do ápice do colón espiral foi definida como o local de avaliação de amostras para histopatologia, considerando que esta região é a mais acometida em animais com lesões macroscópicas de DS.

De forma geral, os resultados encontrados quanto ao início dos sinais clínicos, e presença de lesões macro e microscópicas compatíveis com DS foram superiores nos grupos que receberam nutracêutico, NAI e NPI. Esses animais apresentaram ainda escore de diarreia elevado e eliminação de *B. hyodysenteriae* a partir da terceira coleta de fezes, além da recuperação de espiroquetas fortemente hemolíticas através do isolamento bacteriano em grande parte dos animais. Apesar dos animais no grupo CP terem apresentado menor severidade de DS que os grupos NAI e NPI, quadro clássico da doença foi reproduzido baseado nos sinais clínicos de DS, presença de lesões macroscópicas e histopatológicas acentuadas, além de eliminação do agente nas fezes e isolamento bacteriano de culturas compatíveis com *B. hyodysenteriae*.

No presente estudo foram avaliados os efeitos protetivos e terapêuticos conferidos por nutracêuticos a base de fibras insolúveis incluídos na dieta de suínos, frente a infecção experimental por *B. hyodysenteriae*. Contrariamente ao pressuposto, o uso de nutracêutico à base de fibras insolúveis contribuiu para o agravamento dos quadros de DS, visto principalmente no aumento da eliminação de *B. hyodysenteriae* nas fezes no grupo NAI, demonstrado nos resultados de qPCR.

Assim como no presente estudo, Helm et al. (2020) demonstraram que a inclusão de fibras insolúveis promove efeitos negativos sobre o trato gastrointestinal frente a DS. Segundo os mesmos autores, o efeito de fibras insolúveis na dieta sobre o agravamento da DS pode ser atribuído a maior taxa de fermentação microbiana no intestino grosso, promovido pelo aumento de fibras na dieta, dessa forma favorecendo a colonização do intestino grosso pelas espiroquetas. De acordo com Li et al. (2019), adição de fibras insolúveis na alimentação de suínos desafiados com *Escherichia coli* enteropatogênica agravou o quadro diarreico dos animais e aumentou a excreção do agente através das fezes, resultados similares aos observados neste estudo. A razão para isso ainda não foi elucidada, no entanto é provável que o consumo de fibras insolúveis diminua o tempo de trânsito intestinal da digesta, favorecendo a eliminação de bactérias através das fezes, o que, associado a intensificação do quadro clínico, sugere maior colonização de bactérias patogênicas (Wilfart et al., 2007). Baseado nos estudos de Li et al (2019 e 2020), o aumento de quadros clínicos de *E. coli* enteropatogênica sugere que as fibras insolúveis favoreceram a adesão das bactérias ao intestino dos animais, contribuindo para o estabelecimento da doença e

agravamento no quadro clínico, o que pode ser atribuído também em nosso estudo. Ainda, segundo a Lin et al. (2021) dietas a base de fibras insolúveis alteram a composição das mucinas intestinais, o que auxilia na adesão das bactérias ao epitélio intestinal, fornecendo uma fonte adicional de nutrientes para *B. hyodysenteriae*. No presente trabalho foi demonstrado que a origem, propriedades físico-químicas, além da solubilidade da fibra alimentar afeta a resposta dos suínos às infecções bacterianas (Molist et al., 2014).

Da mesma forma, Pluske et al. (1996) demonstraram que a presença de fibras solúveis confere efeito protetivo contra DS, assim como dietas a base de carboidratos altamente fermentáveis como descrito por Thomsen et al. (2007) e Hansen et al. (2011). Estudos utilizando alimentos altamente digestíveis como amido de milho (Schweer et al., 2019) ou arroz branco cozido (Pluske et al., 1996) promoveram redução a incidência de DS após desafio experimental. Dietas a base de arroz branco cozido foram associadas ao aumento do pH da digesta e à redução das concentrações de ácidos graxos voláteis no intestino grosso de suínos, demonstrando que limitar a fermentação microbiana no intestino grosso dificulta a colonização por *B. hyodysenteriae* (Pluske et al., 1996).

Desse modo, foi comprovado que uma alimentação com alta porcentagem de soja e fibras insolúveis favorece a colonização por *B. hyodysenteriae*, tendo em vista que a soja contém polissacarídeos não amiláceos, que aumentam a fermentação bacteriana no colón, e consequentemente a produção de ácidos graxos voláteis, contribuindo para o desenvolvimento de DS (Durmic et al., 1998, Jacobson et al., 2004).

Semelhantemente, Thomsen et al. (2007) demonstraram que uma dieta contendo raízes de chicória secas, alimento rico em inulina, confere proteção a suínos infectados experimentalmente por *B. hyodysenteriae*. Uma sequência de experimentos de Hansen et al. (2010, 2011) analisou os efeitos protetores dos carboidratos fermentáveis em suínos alimentados com dietas a base de triticale e cevada. Hansen et al. (2011) demonstraram que dietas contendo inulina, obtida a partir de fibras solúveis, foram capazes de impedir o desenvolvimento da DS. No entanto, foi necessária uma alta concentração de inulina (80 g/kg) para proporcionar efeito protetor, o que agregaria alto custo a alimentação dos suínos. Diferentemente das fibras insolúveis, são atribuídos efeitos protetivos às fibras solúveis, por meio da inulina, sobre o trato gastrointestinal (TGI) devido a estimulação seletiva no crescimento de bactérias produtoras de lactato *Bifidobacterium thermacidophilum* no intestino grosso de suínos (Molback et al., 2007). As *Bifidobactérias* estão associadas à suscetibilidade reduzida a patógenos entéricos e infecções intestinais, através da produção de substâncias antimicrobianas ativas contra microrganismos virulentos (Homma, 1988; Gopal et al., 2001). Embora a comparação entre estudos possa ser complexa devido as diferenças entre delineamentos experimentais, pode-se sugerir que a composição de dietas altamente fermentáveis no intestino grosso de suínos é condição importante na proteção contra DS.

Um aspecto fundamental para saúde intestinal é a integridade da barreira intestinal, representada principalmente pelas proteínas de junções oclusivas de membrana, que impedem a passagem de moléculas entre as células epiteliais. Durante a infecção por *B. hyodysenteriae* ocorre um processo inflamatório predominantemente neutrofílico na mucosa intestinal, somado a fatores inerentes ao agente capazes de causar esfoliação epitelial e aumento da permeabilidade intestinal, tornando os animais susceptíveis a infecções secundárias por outros microrganismos (Bruewer et al., 2003; Hampson, 2012; Quintana-Hayashi et al., 2015). Contudo, segundo Helm et al. (2020), em quadros graves de DS, a permeabilidade intestinal pode permanecer inalterada, devido a barreira criada pelo aumento na secreção de muco e alterações nas propriedades das mucinas, tornando o muco intestinal denso e desorganizado. Dessa forma, essa barreira física pode impedir ou reduzir a passagem de moléculas do lúmen intestinal para corrente sanguínea.

Para avaliar a permeabilidade epitelial, empregamos o marcador fluorescente, FITC-Dextran, por meio da sua recuperação no sangue após a administração oral. O FITC-Dextran é uma molécula com alto peso molecular, não permeável ao epitélio intestinal íntegro, incapaz de se ligar a proteínas plasmáticas.

No presente estudo, o grupo com maior permeabilidade intestinal foi o NPI seguido pelo grupo CP. Esperávamos que a indução de DS através da inoculação experimental com *B. hyodysenteriae* propiciaria o desenvolvimento de inflamação e lesões epiteliais, e conseqüentemente, promoveria o aparecimento de FITC-Dextran no sangue, indicando aumento da permeabilidade epitelial à macromolécula, o que foi observado no grupo NPI e CP. Todavia, esses achados divergem dos resultados obtidos por Helm et al. (2020), tendo em vista que o grupo NPI apresentou maiores concentrações de muco intestinal e valores altos de recuperação de FITC no soro, indicam que a presença do muco intestinal não interferiu para a manutenção da integridade intestinal. Deve-se considerar, no entanto, que a produção e formação da barreira formada pelo muco no intestino grosso pode ter sido insuficiente para bloquear o trânsito de macromoléculas no presente estudo. Além disso, é difícil explicar os baixos valores de recuperação de Dextrano no grupo NAI, que apresentou o maior escore composto de lesões histológicas e acentuadas lesões inflamatórias e necróticas. Dessa forma, são necessários maiores estudos para entender os mecanismos fisiológicos subjacentes na interação entre a *B. hyodysenteriae* e o muco intestinal.

Durante a patogênese de muitas doenças gastrointestinais, como na DS, ocorre o aumento da produção de radicais livres no TGI (Glock et al., 1974; Kennedy e Straffuss, 1976; Kubo et al., 1979; Hampson, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que os óleos essenciais extraídos do orégano, como o Carvacrol e o Timol, têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes no trato gastrointestinal dos animais (Srihari et al., 2008; Mueller et al., 2012; Cabello al., 2015; Chengquan et al., 2015; Tian e Piao, 2019).

De acordo com Zou et al. (2016), a adição de óleos essenciais de orégano na dieta de suínos aumentou a ativação da via Nrf2/ARE, importante para regulação da expressão de enzimas antioxidantes. Esses resultados sugerem que esses óleos essenciais podem conferir efeito protetor contra danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo. No presente estudo, apesar da presença de orégano na composição do nutracêutico utilizado, os resultados obtidos divergem com os descritos por Srihari et al. (2008) e Mueller et al. (2012), visto que as concentrações de enzimas antioxidantes GST e SOD foram maiores nos grupos CP e CN, que não receberam nutracêutico, indicando que esse produto não induziu o aumento nas concentrações destas enzimas, e, portanto, não forneceram proteção adicional contra o estresse oxidativo durante a DS.

No entanto as concentrações de proteínas teciduais (PT) e lipoperoxidação (LPO), resultantes da ação dos radicais livres sobre o tecido, apresentaram valores superiores no grupo CP, o que sugere que o estresse oxidativo foi mais expressivo nesse grupo durante a manifestação de DS, corroborando os resultados de Srihari et al. (2008), Mueller et al. (2012) Cabello al. (2015), Chengquan et al. (2015) e Zou et al. (2016). Sugere-se que nutracêuticos a base de fibras insolúveis e orégano seriam capazes de conferir proteção contra radicais livre em algum momento da patogênese de DS. Mas, de qualquer forma, são necessários mais estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes às funções dos óleos essenciais do orégano, sobre o estresse oxidativo durante a DS.

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos através dessa pesquisa demonstram que a utilização de nutracêuticos a base de fibras insolúveis e orégano não foram eficientes para prevenção e tratamento de animais contra a DS induzida por *B. hyodysenteriae*. Pelo contrário, os animais que receberam o nutracêutico apresentaram quadros de DS mais graves em relação ao grupo CP, baseado na apresentação de lesões macroscópicas, histopatológicas, eliminação da bactéria nas fezes e aumento na permeabilidade intestinal. Contudo, embora os grupos que receberam nutracêutico não tenham apresentado aumento nas enzimas antioxidantes, as concentrações de LPO e PT foram menores nesses grupos, sugerindo que os nutracêuticos podem ter fornecido proteção contra o estresse oxidativo frente a DS nos grupos tratados. Contudo, são necessárias mais informações para discriminar os efeitos dos nutracêuticos a base de fibras insolúveis e orégano sobre o estresse oxidativo durante a DS.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. The Effects of Stabilized Extracts of Sage And Oregano On The Oxidations Of Salad Dressing. *Eur. Food Resour.* p. 551-560, 2001.
- ALEXANDER, T.J. & TAYLOR, D.J., The Clinical Signs, Diagnosis And Control Of Swine Dysentery. *Vet. Rec.* 85, 59–63, 1969.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Brasília: Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia - GEARE Gerência Geral de Alimentos – GGALI, 2018.
- AKIBA, J., NAKAMURA, M., NAGATA, H. et al. Acid-Sensing Pathways In Rat Gastrointestinal Mucosa. *J. Gastroenterol.* v.37, p. 133 – 138, 2002.
- ARGENZIO, R. A.; WHIPP, S. C.; GLOCK, R. D. Pathophysiology of Swine Dysentery: Colonic Transport and Permeability Studies. *J Infect Dis.* v. 142, n. 5, 1980.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A., MARTÍNEZ-LOBO, F.J., ARGUELLO, H., et al. Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 10, p.1927-1947, 2013.
- BARBOSA, N. L., RALL, V. LM., FERNANDES, A. A. L. H. et al. Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. *Foodborne Pathog. Dis.* v. 6, 2009.
- BARCELLOS, D. E. S. N., M. DE UZEDA, N. IKUTA, V. R. Identification Of Porcine Intestinal Spirochetes By PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Of Ribosomal. *Vet Microbiol.* v 75, p 189-198, 2000.
- BARCELLOS, D. E., RAZIA, L. E., BOROWSKI, S. M. Ocorrência E Identificação De Espiroquetas Intestinais Em Suínos Em Granjas De Porte Industrial De Duas Regiões Criatórias Do Estado Do Rio Grande Do Sul, Em Relação À Medicação Da Ração. *Ciênc. Rural*, v. 33, n. 4, p. 725–729, 2003.
- BLACK, M. MOOLHUIJZEN, P., BARRERO, R., et al. Analysis Of Multiple *Brachyspira Hyodysenteriae* Genomes Confirms That The Species Is Relatively Conserved But Has Potentially Important Strain Variation. *PLoS ONE*, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.
- BASÍLICO, M. Z., BASÍLICO, J. C. Inhibitory Effects of Some Spice Essential Oils on *Aspergillus Ochraceus* NRRL 3174 Growth And Ochratoxin A Production. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 29, p. 238-24, 1999.
- BELLEGARD, M. I., WANCHANTHUEK, P., LA, T. et al. Genome Sequence Of The Pathogenic Intestinal Spirochete *Brachyspira Hyodysenteriae* Reveals Adaptations To Its Lifestyle In The Porcine Large Intestine. *PLoS ONE*, v. 4, n. 3, 2009.
- BENDINI, A., GALLINA-TOSCHI, T., LERCKER, G. Antioxidant Activity of Oregano (*Origanum Vulgare* L.) Leaves. *Ital. J. Food Sci.* v.14, p. 17-23, 2002.
- BRUEWER M., LUEGERING A., KUCHARZIK T. et al. Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function By Apoptosis-Independent Mechanisms. *J Immunol.* v 72, p 171-6164, 2003.
- BURROUGH, E. R., ARRUDA, B. L., PLUMMER, P. J. Comparison Of The Luminal And Mucosa-Associated Microbiota In The Colon Of Pigs With And Without Swine Dysentery. *Front. Vet. Sci.* v 4, p139, 2017.
- CABELLO, M. L. R.; PRAENA, D. G.; PICHARDO, M. P. S.; JOS, A.; CAMEÁN, A M. In Vitro Pro-Oxidant/Antioxidant Role Of Carvacrol, Thymol And Their Mixture In The Intestinal Caco-2 Cell Line. *Toxicology in Vitro.* v 29, p 647-656, 2015.

- CALDERARO, A., BOMMEZZADRI, S., PICCOLO, G., et al. Rapid Isolation Of *Brachyspira Hyodysenteriae* And *Brachyspira Pilosicoli* From Pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 105, p. 229–234, 2005.
- CADENAS, S., ROJAS, C., CAMPO, R. P. et al. Effect Of Dietary Vitamin C And Catalase Inhibition On Antioxidants And Molecular Markers Of Oxidative Damage In Guinea Pigs. *Free Radic Res.* v. 21, n 2, p. 109-118, 1994.
- CHANDER, Y., PRIMUS, A., OLIVEIRA, S., et al. Phenotypic And Molecular Characterization Of A Novel Strongly Hemolytic *Brachyspira* Species, Provisionally Designated " *Brachyspira Hampsonii* ". *J. VET. Diagn. Invest.* v24, n5, p903–910, 2012.
- CHENG, P. YANG, Y. LI, et al. The Prevalence And Mechanism Of Fluoroquinolone Resistance In *Escherichia Coli* Isolated From Swine Farms In China. *BMC Vet Res.* v16, p258, 2020.
- CERVATO, G., CARABELLI, M., GERVASIO, S. et al. Antioxidant Properties Of Oregano (*Origanum Vulgare*) Leaf Extracts *J. Food Biochem.* v.24, p. 453-465, 2000.
- COSTA D, POETA P, SAENZ Y, et al. Prevalence Of Antimicrobial Resistance And Resistance Genes In Faecal *Escherichia Coli* Isolates Recovered From Healthy Pets. *Vet Microbiol.* v127(1–2), p97–105, 2008.
- DAMECHKI, M., SOTIROPOULOU, S., TSIMIDOU, M. Antioxidant and Pro-Oxidant Factors In Oregano And Rosemary Gourmet Olive Oils. *Grasasaceites.* v.52, p. 207-213, 2001.
- DANIEL, A. G.S., SATO, J.P.H., GABARDO, M. P., et al. Minimum Inhibitory Concentration Of Brazilian *Brachyspira Hyodysenteriae* Strains. *Pesqui. Vet. Bras.*, 37(4), 331- 338, 2017.
- DE LUCA, S., NICHOLSON, P., MAGISTRALIB, C. F. et al. Transposon-Associated Lincosamide Resistance Lnu (C) Gene Identified In *Brachyspira hyodysenteriae* ST83. *Vet Microbiol.* v. 214, p, 51-55, 2018.
- DORMAN, H. J. D., DECANES, S. G. Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity Of Plant Volatile Oils *J. Appl. Microbiol.* v. 88, p. 308-316, 2000.
- DURMIC Z., PETHICK D.W., PLUSKE J.R., et al. Changes In Bacterial Populations In The Colon Of Pigs Fed Different Sources Of Dietary Fibre, And The Development Of Swine Dysentery After Experimental Infection. *J. Appl. Micro-biol.* v85, p574–582, 1998.
- ENNS, C. B.; HARDING, J. C. S., LOEWEN, M. E. Decreased Electrogenic Anionic Secretory Response In The Porcine Colon Following In Vivo Challenge With *Brachyspira* Spp. Supports An Altered Mucin Environment. *AJP-Gastrointest Liver Physiol.* v. 316 p 495–G508. 2019.
- GAO, R., YUAN, Z., ZHAO, Z. et al. Mechanism Of Pyrogallol Autoxidation And Determination Of Superoxide Dismutase Enzyme Activity. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* v45, p 41–45, 1998.
- GLOCK, R.D., HARRIS, D.L., KLUGE, J.P. Localization Of Spirochetes With The Structural Characteristics Of *Treponema Hyodysenteriae* In The Lesions Of Swine Dysentery. *Infect. Immun.* v9, p167-178, 1974.
- GOPAL, P.K., PRASAD, J., SMART, J. et al. In Vitro Adherence Properties Of *Lactobacillus Rhamnosus* DR20 And *Bifidobacterium Lactis* DR10 Strains And Their Antagonistic Activity Against An Enterotoxigenic *Escherichia Coli*. *Int J Food Microbiol.* v67, p207– 216, 2001.
- GUEDES, R.M.C., 2010. Controle Racional Das Diarreias De Recria E Terminação. *Acta Sci. Vet.* v38, p247–256.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W. Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *J Biol Chem.* 1974.
- HOMMA, N. Bifidobacteria As A Resistance Factor In Human Beings. *Bifidobacteria. Microfl.* v7, p35 – 43, 1988.

HAMPSON, D. J., COMBS, B. G., HARDERS, S. J., et al. Isolation Of *Treponema Hyodysenteriae* From A Wild Rat Living On A Piggery. *Aust. Vet. J.* v68, p308, 1991.

HAMPSON, D.J. *Brachyspira* l colitis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.680-696, 2012.

HAMPSON, D.J., LA, T., PHILLIPS, N.D. et al. *Brachyspira Hyodysenteriae* Isolated From Apparently Healthy Pig Herds Following An Evaluation Of A Prototype Commercial Serological ELISA. *Vet. Microbiol.* v191, p15–9, 2016.

HAMPSON, D. J., WANG, P. Colonic Spirochetes: What Has Genomics Taught Us? Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 415, p. 273–294, 2018.

HAN, P. F., WEI, L., DUANC, Z. G. et al. Contribution Of IL-1 β , 6 And TNF-A To The Form Of Post-Traumatic Osteoarthritis Induced By “Idealized” Anterior Cruciate Ligament Reconstruction In A Porcine Model. *Int. Immunopharmacology.* v65, p 212-220, 2018.

HANSEN, C. F., PHILLIPS, N. D., LA, T., et al. Diets Containing Inulin But Not Lupins Help To Prevent Swine Dysentery In Experimentally Challenged Pigs. *J Anim Sci.* v88, p3327–36, 2010.

HANSEN, C, F., HERNANDEZ, A., MANSFIELD, J. et al. A High Dietary Concentration Of Inulin Is Necessary To Reduce The Incidence Of Swine Dysentery In Pigs Experimentally Challenged With *Brachyspira Hyodysenteriae*. *Br. J. Nutr.* v13, p106-1506, 2011.

HELM, E. T, LIN, S. J, GABLER, N. K., et al. *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Reduces Digestive Function but Not Intestinal Integrity in Growing Pigs While Disease Onset Can Be Mitigated by Reducing Insoluble Fiber. *Front. Vet. Sci.* v7, Article 587926, 2020.

HIRAOKA, T., FUKUWATARI, T., IMAIZUMI, M. et al. Effects of Oral Stimulation with Fats Onn The Cephalic Phase Of Pancreatic Enzyme Secretion In Esophagostomized Rats. *Physiol. Behav.* v. 79, p. 713-717, 2003.

HUMPHREY, S. B., STANTON, T. B., JENSEN, N. S. et al. Purification And Characterization Of Vsh-1, A Generalized Transducing Bacteriophage Of *Serpulina Hyodysenteriae*. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 2, p. 323–329, 1997.

JACOBSON, M., FELLSTRÖM, C., LINDBERG, R. Experimental Swine Dysentery: Comparison Between Infection Models. *J Med Microbiol.* v. 53, p. 273-280, 2004.

JALILI, T., WILDMAN, R. E. C.; MEDEIROS, D. M. Nutraceutical Roles of Dietary Fiber, *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, v2:4, p19-34, 2000.

JI, X., ZHANG, Q., ZHENG, W., YAO, W. Morphological and Molecular Response Of Small Intestine To Lactulose And Hydrogen rich Water In Female Piglets Fed Fusarium Mycotoxins Contaminated Diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* v10, p 9-13, 2019.

JIANG, Z. Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLFF, S.P. Lipid Hydroperoxide Measurement By Oxidation Of Fe²⁺ In The Presence Of Xylenol Orange. Comparison With The TBA Assay And An Iodometric Method. *Lipids.* v26, p853–856, 1991.

KATSCHINSKI, M. Nutritional Implications of Cephalic Phase Gastrointestinal Responses. *Appetite.* v.34, p. 189-196, 2000.

KENNEDY, G. A. & STRAFUSS, A. C. Scanning Electron Microscopy Of The Lesions Of Swine Dysentery. *Am. J. Vet. Res.* v37, p395-40 1, 1976.

KUBO, M., M. NAKAGAWA, M. KASHIWAZAKI, et al. Pathological Observation On Experimental Swine Dysentery. *Natl. Inst. Anim. Health Quart.* v 19, p83–90, 1979.

KUNKLE, R.A., HARRIS, D.L., KINYON, J.M. Autoclaved Liquid Medium For Propagation Of *Treponema Hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol.* v. 24, p.669-671, 1986.

- LA, T., PHILLIPS, N.D., HAMPSON, D.J. Development of A Duplex PCR Assay For The Detection Of *Brachyspira hyodysenteriae* And *Brachyspira pilosicoli* In Pig Feces. *J. Clin. Microbiol.* v41, p 3372–3375, 2003.
- LA, T., PHILLIPS, N. D., WANCHANTHUEK, P. et al. Evidence That The 36kb Plasmid Of *Brachyspira Hyodysenteriae* Contributes To Virulence. *Vet. Microbiol.* v. 153, n. 1–2, p. 150–155, 2011.
- LARRONDO, J. V.; AGUT, M.; CALVO, M. A. Antimicrobial Activity of Essences From Labiates. *Microbios.* v. 82, p. 171-172, 1995.
- LAUGERETTE, F., PASSILLY, DEGRACE, P. et al. CD36 Involvement In Orosensory Detection Of Dietary Lipids, Spontaneous Fat Preference, And Digestive Secretions. *J. Clin. Invest.* v. 115, p. 3177-3184, 2005.
- LEE, D. W., KIM, J. S., KIM, I. Y. et al. Catheter-Based Renal Sympathetic Denervation Induces Acute Renal Inflammation Through Activation Of Caspase-1 And NLRP3 Inflammasome. *Anatol J Cardiol.* v21, p134-41, 2019.
- LEMCKE, R. M., BEW, J., BURROWS, M. R. The Growth of *Treponema hyodysenteriae* And Other Porcine Intestinal Spirochetes In A Liquid Medium. *Res Vet Sci.* v. 26, p.315-319, 1979.
- LESER, T.D., MØLLER, K., JENSEN, T.K. Specific Detection Of *Serpulina Hyodysenteriae* And Potentially Pathogenic Weakly β -Haemolytic Porcine Intestinal Spirochetes By Polymerase Chain Reaction Targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes.* v.11, p.363-372, 1997.
- LI, Q., BURROUGH E. R., GABLER N. K. et al. A Soluble And Highly Fermentable Dietary Fiber With Carbohydrases Improved Gut Barrier Integrity Markers And Growth Performance In F18 ETEC Challenged Pigs. *J. Anim. Sci.* v97, p2139–2153, 2019.
- LI, Q., PENG, X.; BURROUGH, E,R.. et al. Dietary Soluble and Insoluble Fiber With or Without Enzymes Altered the Intestinal Microbiota in Weaned Pigs Challenged With Enterotoxigenic *E. coli* F18. *Front. Microbiol.* v11, p1110, 2020.
- LIN, S. J. H.; ARRUDA, B.; BURROUGH, E. Alteration of Colonic Mucin Composition and Cytokine Expression in Acute Swine Dysentery. *Vet. Pathol.* p 1-11, 2021.
- LUNA, L.G. *Routine Staining Procedures: Manual of Histologic Staining. Methods of The Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book.* p. 24-58, 1968.
- MACEDO, N.R., OLIVEIRA, S.R., LAGE., A.P. et al. ERIC-PCR Genotyping Of *Haemophilus Parasuis* Isolates From Brazilian Pigs. *The Vet J.* v.188, p. 362-364, 2011.
- MAHU, M., PASMANS, F., VRANCKX, K. et al. Presence And Mechanisms Of Acquired Antimicrobial Resistance In Belgian *Brachyspira hyodysenteriae* Isolates Belonging To Different Clonal Complexes. *Vet. Microbiol.* v. 207, p125–132, 2017.
- MARTINEZ-LOBO, F.J., HIDALGO, A., GARCIA, M., et al. First Identification Of "Brachyspira Hampsonii" In Wild European Waterfowl. *PLoS One* v8:12, p e82626, 2013.
- MARTINEZ-TOMÉ, M.; JIMENEZ, A. M.; RUGGIERI, S.; et al. Antioxidant Properties Of Mediterranean Spices Compared With Common Food Additives. *J. Food Protect.* v 64, p. 1412-1419, 2001.
- MILNER, J. A., SELLWOOD, R. Chemotactic Response To Mucin By *Serpulina Hyodysenteriae* And Other Porcine Spirochetes: Potential Role In Intestinal Colonization. *Infect. Immun.* v. 62, n. 9, p. 4095–4099, 1994.
- MIRAJKAR, N.S. & GEBHART, C.J. Understanding The Molecular Epidemiology And Global Relationships Of *Brachyspira Hyodysenteriae* From Swine Herds In The United States: A Multi-Locus Sequence Typing Approach. *PLoS One.* v9, p107176, 2014.
- MØLBAK L, THOMSEN LE, JENSEN TK, et al. Increased Amount Of Bifidobacterium *Thermacidophilum* And *Megasphaera Elsdenii* In The Colonic Microbiota Of Pigs Fed A Swine

- Dysentery Preventive Diet Containing Chicory Roots And Sweet Lupine. *J Appl Microbiol.* v1867, p103, 1853, 2007.
- MOLIST, F., VAN, O. M., PÉREZ, J., et al. Relevance Of Functional Properties Of Dietary Fibre In Diets For Weanling Pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* v189, p1-10, 2014.
- MOTRO, Y., LA, T., BELLGARD, M. I. et al. Identification Of Genes Associated With Prophage-Like Gene Transfer Agents In The Pathogenic Intestinal Spirochaetes *Brachyspira Hyodysenteriae*, *Brachyspira Pilosicoli* And *Brachyspira Intermedia*. *Vet. Microbiol.* v. 134, n. 3–4, p. 340–345, 2009.
- MUELLER, N. K., BLUM, M., KLUGE, H., et al. Influence Of Broccoli Extract And Various Essential Oils On Performance And Expression Of Xenobiotic- And Antioxidant Enzymes In Broiler Chickens. *Br J Nutr.* v 108, p. 588–602, 2012.
- OHARA, I., OTSUKA, S. I., YUGARI, Y. Cephalic Phase Response of Pancreatic Exocrine Secretion In Conscious Dogs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* v.17, p. G424-G428, 1988.
- OLIVEIRA, B. R. GUNDIM, L.F., LIMA, A.M.C et al. Investigação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com diarreia no Espírito Santo, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* v. 38, n. 3, p. 287–291, 2016.
- OMONJO, F. A., NI, L., GONG, J. et al. Essential Oils As Alternatives To Antibiotics In Swine Production. *Anim. Nutr.* v. 4, p. 126 e 136, 2018.
- PLATEL, K., SRINIVASAN, K. Stimulatory Influence Of Select Spices On Bile Secretion In Rats. *Nutr. Res.* v 20, p. 1493-1503, 2000.
- PHILLIPS, N.D., LA, T., ADAMS, P.J. et al. Detection Of *Brachyspira Hyodysenteriae*, *Lawsonia Intracellularis* And *Brachyspira Pilosicoli* In Feral Pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 134, p. 294-299, 2009.
- PLUSKE JR, SIBA PM, PETHICK DW, et al. The Incidence Of Swine Dysentery In Pigs Can Be Reduced By Feeding Diets That Limit The Amount Of Fermentable Substrate Entering The Large Intestine. *J. Nutr.* v 33, p 126-2920, 1996.
- QUINTANA-HAYASHI, M. P., MAHU, M., DE PAUW, N. The Levels of *Brachyspira hyodysenteriae* Binding To Porcine Colonic Mucins Differ Between Individuals, And Binding Is Increased To Mucins From Infected Pigs With *De Novo* MUC5AC Synthesis. *Infect Immun.* v. 83, p.1610–9, 2015.
- ROSTAGNO, H.S; ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L. et al. Tabelas Brasileiras Para Aves E Suínos. Composição De Alimentos E Exigências Nutricionais. 2º ed. Viçosa, MG. Departamento de Zootecnia. 186p, 2005.
- ROTA, C., CARRAMINANA, J. J., BURILLO, A. Herrerain Vitro Antimicrobial Activity Of Essential Oils From Aromatic Plants Against Selected Foodborne Pathogens. *J. Food Protection.* v. 67, p. 1252-1256, 2004.
- RUBIN, J. E.; COSTA, M. O.; HILL, J. E. et al. Reproduction Of Mucohaemorrhagic Diarrhea And Colitis Indistinguishable From Swine Dysentery Following Experimental Inoculation With “*Brachyspira Hampsonii*” Strain 30446. *PLOS ONE.* v.8, e57146, 2013.
- SATO, J. P. H., DANIEL, A. G. de S., GUEDES, R. M. C. Evolução Da Infecção Por *Brachyspira Hyodysenteriae* Nos Últimos Anos No Brasil E Medidas De Controle Adotadas. In: IX SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura, Anais. 2015.
- SATO, J.P.H. Diversidade Genética E Virulência De Amostras De *Brachyspira Hyodysenteriae* Isoladas De Suínos Assintomáticos E Com Doença Clínica. Tese UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2017.

- SCHWARZ S, KEHRENBURG C, WALSH TR. Use Of Antimicrobial Agents In Veterinary Medicine And Food Animal Production. *Int J Antimicrob Agents*. v17(6), p431–7, 2001.
- SCHWEER WP, BURROUGH ER, PATIENCE JF, et al. Impact Of *Brachyspira Hyodysenteriae* On Intestinal Amino Acid Digestibility And Endogenous Amino Acid Losses In Pigs. *J Anim Sci*. v 68, p 97-257, 2019.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation Of Total, Protein-Bound, And Nonprotein Sulfhydryl Groups In Tissue With Ellman's Reagent. *Anal. Biochem*. v25, p192–205, 1968.
- SEQUEIRA, I. R.; LENTLE, R. G., KRUGER, M. C., et al. The Effect Of Aspirin And Smoking On Urinary Excretion Profiles Of Lactulose And Mannitol In Young Women: Toward A Dynamic, Aspirin Augmented, Test Of Gut Mucosal Permeability. *Neurogastroenterol. Motil*. v. 24, p 401, 411, 2012.
- SEQUEIRA, I. R., LENTLE, R. G., KRUGER, M. C., et al. Standardizing the Lactulose Mannitol Test of Gut Permeability to Minimize Error and Promote Comparability. *Plos One*. v. 9, issue. 6, e. 99256, 2014.
- SONG, Y. & HAMPSON, D.J. Development Of A Multiplex Qpcr For Detection And Quantitation Of Pathogenic Intestinal Spirochaetes In Pigs And Chickens. *Vet. Microbiol*. v137, p129– 136, 2009.
- SONG, Y, LA, T, PHILLIPS, ND et al. Development Of A Serological ELISA Using A Recombinant Protein To Identify Pig Herds Infected With *Brachyspira Hyodysenteriae*. *Vet. J*. v206, p365–370, 2015.
- SRIHARI, T., SENGOTTUVELAN, M., NALINI., N. Dose-Dependent Effect Of Oregano (*Origanum Vulgare* L.) On Lipid Peroxidation And Antioxidant Status In 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Rat Colon Carcinogenesis. *Int. J. Pharm. Pharm*. v 60, p 787–794, 2008.
- STANTON, T.B., ROSEY, E.L., KENNEDY, M.J. Isolation, Oxygen Sensitivity, And Virulence Of NADH Oxidase Mutants Of The Anaerobic Spirochete *Brachyspira* (*Serpulina*) *Hyodysenteriae*, Etiologic Agent Of Swine Dysentery. *Appl. Environ. Microbiol*. v 65, p5028-5034, 1999.
- STANTON, T. B., HUMPHREY, S. B., SHARMA, V. K., et al. Collateral Effects of Antibiotics: Carbadox and Metronidazole Induce VSH-1 and Facilitate Gene Transfer among *Brachyspira hyodysenteriae* Strains. *Appl Environ Microbiol*. v. 74, n. 10, p. 2950–2956, 2008.
- SUH, D.K.; SONG, J.C. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* In Swine Herds. *J. Vet. Sci*. v.6, n.4, p.289-293, 2005.
- CHENGQUAN, T.; HONGKUI, W.; HAIQING, S.; et al. Effects of Dietary Supplementation of Oregano Essential Oil to Sows on Oxidative Stress Status, Lactation Feed Intake of Sows, and Piglet Performance ", *BioMed Reserch. Int*. v. 34, p. 206-213, 2015.
- TERPSTRA, J.I., AKKERMANS J.P.W.M., OUWERKERK, H. Investigations Into The Etiology Of Vibrionic Dysentery (Doyle) In Pigs. *Netherlands J. Vet. Sci*. p 1-5, 1968.
- THOMSON, J.R. & FRIENDSHIP, R.M. Digestive System In: Zimmernann J.J., KARRIKER LOCKE A. RAMIRES A., SCHWARTZ KENT J., STEVENSON GREGORY W. (ed.), *Disease of Swine: 10th Edition*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2012.
- THOMSEN LE, KNUDSEN KE, JENSEN TK, et al. The Effect Of Fermentable Carbohydrates On Experimental Swine Dysentery And Whip Worm Infections In Pigs. *Vet. Microbiol*. v 63, p 119-152, 2007.
- TIAN, Q.; PIAO, X. Essential Oil Blend Could Decrease Diarrhea Prevalence by Improving Antioxidative Capability for Weaned Pigs. *Animals*. v 9, p847. 2019.
- VAN DEN BOGAARD AE, STOBBERINGH EE. Epidemiology Of Resistance To Antibiotics. Links Between Animals And Humans. *Int J Antimicrob Agents*. v14(4), p327–35, 2000.

- VENKATAKRISHNAN, V., QUINTANA-HAYASHI, M. P., MAHU, M., et al. *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Regulates Mucin Glycosylation Synthesis Inducing an Increased Expression of Core-2 O-Glycans in Porcine Colon. *Journal of Proteome Research*. v.16, p. 1728–1742, 2017.
- VICUÑA, E. A., KUTTAPPAN, V. A., TELLEZ, G. et al. Dose Titration Of FITC-D For Optimal Measurement Of Enteric Inflammation In Broiler Chicks. *Poult. Sci.* v94, p 1353–1359, 2015.
- VIEIRA-POTTER, V. J., LEE, S., BAYLESS, D. S., et al. Disconnect Between Adipose Tissue Inflammation and Cardiometabolic Dysfunction in Ossabaw Pigs. *Obesity*. v23, p2421–2429, 2015.
- VIOTT, A. M., LAGE, A. P., CRUZ JUNIOR, E. C. C. et al. The Prevalence Of Swine Enteropathogens In Brazilian Grower And Finish Herds. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 145–151, 2013.
- WHITING R.A., DOYLE, L.P., SPRAY, R.S. Swine Dysentery. *Bulletin*: p3–15, 1921.
- WILCOCK, B. P., OLANDER, H. J. Studies on The Pathogenesis of Swine Dysentery. I. Characterization of The Lesions In Colons And Colonic Segments Inoculated With Pure Cultures Or Colonic Content Containing *Treponema hyodysenteriae*. *Vet .Pathol.* v.16, p.450–465, 1979.
- WILFART, A.; MONTAGNE, L., SIMMINS, H. et al. Digesta Transit In Different Segments Of The Gastrointestinal Tract Of Pigs As Affected By Insoluble Fibre Supplied By Wheat Bran. *Br. J. Nutr.* v98, p54–62, 2007.
- ZEISEL, S. H. Regulation of Nutraceuticals. *Science*. v. 285 p1853-55,1999.
- ZLOTOWSKI, P., DRIEMEIER, D., BARCELLOS, D.E.S.N. de. Patogenia Das Diarréias Dos Suínos: Modelos E Exemplos. *Act. Sci. Vet.* v.36, p.s81-s86, 2008.
- ZOU, Y., WANG, J., PENG, J., WEI, H. Oregano Essential Oil Induces SOD1 And GSH Expression Through Nrf2 Activation And Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage In IPEC-J2 Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* v598, p71-83, 2016.