

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE
COLOSTRO NA ONTOGENIA IMUNE E
AMADURECIMENTO INTESTINAL DO LEITÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SHAIANA SALETE MACIAG

GUARAPUAVA-PR

2022

SHAIANA SALETE MACIAG

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE COLOSTRO NA
ONTOGENIA IMUNE E MATURAÇÃO INTESTINAL DO LEITÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Sustentável, para obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Ana Paula Almeida Bastos

GUARAPUAVA-PR
2022

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

Maciag, Shaiana Salete

M152i

Influência de diferentes fontes de colostro na ontogenia imune e amadurecimento intestinal do leitão / Shaiana Salete Maciag. – – Guarapuava, 2022.

xiv, 92 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Área de concentração: Saúde e Produção Animal Sustentável, 2022.

Orientadora: Ana Paula Almeida Bastos

Banca Examinadora: Adriana Ibelli, Danielle Gava

Bibliografia

1. Paridade. 2. Imunidade passiva. 3. Imunidade celular. 4. Duodeno. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE/UNICENTRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPEP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGCV

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 05/2022- PPGCV

Às oito horas e trinta minutos do dia trinta e um de março de dois mil e vinte e dois, na EMBRAPA - SC, sob a presidência da Prof. Dr. Ana Paula Almeida Bastos, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, da pós-graduanda **Shaiana Salete Maciag**, constituída pela Prof. Dr. Ana Paula Almeida Bastos - orientadora – EMBRAPA-SC, Prof. Dr. Danielle Gava – EMBRAPA - SC e a Prof. Dr. Adriana Mércia Guaratini Ibelli – EMBRAPA --SC. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. A seguir, a candidata passou a apresentação do trabalho intitulado "*Influência de diferentes fontes de colostro na ontogenia imune e amadurecimento intestinal do leitão*". Encerrada a apresentação, a candidata foi arguida oralmente pelos membros da Banca Examinadora. Após avaliação, a banca considerou o trabalho aprovado. A presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, está condicionada ao depósito da versão definitiva impressa e em meio eletrônico da dissertação, com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador no prazo de 60 dias, e demais exigências da legislação vigente. O não atendimento no prazo, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do título, bem como o recebimento do diploma. Esta ata de Defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, e o título obtido deverá ser homologado pelo Comitê de Pós-Graduação. Nada mais havendo a ser tratado, a presente ata foi lavrada e assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Prof. Dr. Ana Paula Almeida Bastos – EMBRAPA -SC


Presidente

Prof. Dr. Danielle Gava – EMBRAPA -SC

Membro

Prof. Dr. Adriana Mércia Guaratini Ibelli – EMBRAPA -SC

Membro

	Certificado*	ÉTICA 1/1
---	--------------	--------------

*Em concordância com a Orientação Técnica CONCEA no 5, de 27 de abril de 2015

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos componentes imunológicos do colostro fresco e congelado suíno", protocolo nº001/2016, sob a responsabilidade de Ana Paula de Almeida Bastos – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Embrapa Suínos e Aves, em reunião dia 30/06/2020, onde foi avaliada a solicitação da prorrogação da proposta devido à atrasos no recebimento de material para execução das análises.

Vigência do Projeto	01/08/2016 – 31/03/2022
Espécie/linhagem	<i>Sus scrofa domesticus</i> (suíno)
Nº de animais aprovados	24
Peso/Idade	110kg/ 150 dias
Sexo	Fêmeas
Origem (fornecedor)	Embrapa Suínos e Aves



Presidente CEUA/CNPSA

Dedico este trabalho a meus pais, Neide e Sérgio, a meus irmãos, André e Moisés, por tudo que fazem por mim e por sempre me incentivarem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por me dar forças, fé e por me fazer acreditar que tudo é possível.

Agradeço imensamente à minha família; meus pais: Neide e Sérgio, meus irmãos: André e Moisés, que sempre me apoiaram e incentivaram para seguir meus sonhos e objetivos, e principalmente pelo apoio financeiro, que foi fundamental.

Ao meu namorado Luís Henrique, por todo apoio, companheirismo e incentivo nas minhas decisões.

Agradeço imensamente à minha orientadora Professora Dr. Ana Paula Bastos que foi uma pessoa fundamental no processo, a quem admiro muito. Agradeço pelo incentivo, motivação, amizade, empatia e por toda paciência que teve de me ensinar e compreender meus erros.

À Embrapa Suínos e Aves, por todo suporte estrutural, financeiro e técnico para a realização da pesquisa, bem como pela concessão da bolsa de estudos juntamente com o CNPq.

À Universidade do Centro-Oeste do Paraná pela oportunidade da realização do mestrado acadêmico.

À toda equipe do laboratório de sanidade e genética animal pela disponibilidade e prontidão e que não mediram esforços para ajudar na execução do projeto.

À toda equipe de colaboradores da granja de reprodutores suínos certificados da Embrapa Suínos e Aves por todo apoio e ajuda no manejo dos animais, inclusive fora do horário de expediente.

À equipe do laboratório de Imunologia e Nanotecnologia da Embrapa Suínos e Aves, do qual fiz parte juntamente com Ana Paula Bastos, Franciana Bellaver, Francisco Noé da Fonseca, Lana Baron, Gabrielly Bombassaro e Vanessa Haach, agradeço por toda ajuda, engajamento no projeto, conhecimento repassado, empatia, paciência e amizade que se criou ali.

Agradeço aos estagiários que passaram pelo laboratório durante o período e que sempre mostraram disposição e proatividade contribuindo para realizar as atividades necessárias.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

(Ana Vilela)

RESUMO

Shaiana Salete Maciag Influência de diferentes fontes de colostro na ontogenia imune e maturação intestinal do leitão 2022. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Guarapuava - PR.

O colostro é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência do neonato suíno pois é a única forma de aquisição de imunidade materna. O objetivo deste estudo foi comparar a influência do colostro de marrãs, porcas e sucedâneos lácteos na ontogênese imunológica e maturação intestinal em leitões. Para isso, 60 leitões de 9 matrizes (OP> 5 e OP1), foram divididos em seis grupos: nascido da leitoa ou porca que permaneceu com a mãe durante todo o período (PP/LL); nascido da leitoa ou porca que ingeriu colostro de outra porca/leitoa (LP/PL); nascido da leitoa ou porca que foi alimentado com sucedâneo (LS/PS). Os leitões permaneceram nos grupos dietéticos por 24 horas após o nascimento, e depois foram devolvidos para suas devidas mães. Os leitões foram eutanasiados nos dias 1 e 28 de idade para avaliação das concentrações de imunoglobulinas e citocinas no colostro e no soro dos leitões. Amostras do baço, linfonodo, timo foram coletadas para avaliar a ontogênese imune e intestino delgado para avaliar a maturação intestinal. A concentração de imunoglobulinas, citocinas Th1, Th2 e Th17 e a capacidade das células B e T dos órgãos linfáticos e das células mononucleares do sangue de responder aos mitógenos foi maior nos grupos que ingeriram colostro de porcas nas primeiras 24 horas de vida, sendo menor nos grupos alimentados com sucedâneo. Não houve diferença na maturação intestinal dos grupos. Portanto, sugerimos um possível papel da paridade na composição do colostro, que contribui para exercer uma ação moduladora no desenvolvimento da resposta imune, e que o sucedâneo afeta negativamente o desenvolvimento imune e a maturação intestinal, não sendo recomendado como substituto de colostro.

Palavra-chave: paridade; imunidade passiva; imunidade celular; duodeno

ABSTRACT

Shaiana Salete Maciag Influence of different sources of colostrum on the immune ontogeny and intestinal maturation of the piglet 2022. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Guarapuava - PR.

Colostrum is essential for the development and survival of the swine neonate as it is the only way to acquire maternal immunity. The aim of this study was to compare the influence of colostrum from gilts, sows and dairy substitutes on immunological ontogenesis and intestinal maturation in piglets. For this, 60 piglets from 9 sows (OP^{>5} and OP1) were divided into six groups: born from the sow or sow that remained with the mother throughout the period (SS/GG); born from the sow or sow that ingested colostrum from another sow/pill (GS/SG); born from the sow or sow that was fed with milk replacer (GMR/SMR). Piglets remained in the diet groups for 24 hours after birth, and were then returned to their respective mothers. Piglets were euthanized on days 1 and 28 of age to evaluate the concentrations of immunoglobulins and cytokines in the colostrum and serum of the piglets. Spleen, lymph node, thymus samples were collected to assess immune ontogenesis and small intestine to assess intestinal maturation. The concentration of immunoglobulins, Th1, Th2 and Th17 cytokines and the ability of B and T cells from lymphatic organs and blood mononuclear cells to respond to mitogens were higher in the groups that ingested colostrum from sows in the first 24 hours of life, being lower in the groups fed with milk replacer. There was no difference in the intestinal maturation of the groups. Therefore, we suggest a possible role of parity in colostrum composition, which contributes to exert a modulating action in the development of the immune response, and that the replacer negatively affects immune development and intestinal maturation, not being recommended as a colostrum substitute.

Keywords: parity; passive immunity; cellular immunity; duodenum

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Division of experimental groups.....	60
Table 2. Mean concentration of immunoglobulins (mg/mL) in piglets serum in different experimental groups.....	66
Table 3. Levels of plasma cytokines (ng/mL) in piglet groups. Data are shown as Mean \pm SEM.	67
Table 4. Stimulation proliferation index for lymphocytes from peripheral blood among all groups and experimental conditions.	68
Table 5. Stimulation proliferation index for lymphocytes from lymphoid organs at 24 hours of age.	69
Table 6. Stimulation proliferation index for lymphocytes from lymphoid organs at weaning period (28 days of age).....	70

CAPÍTULO II

Tabela 1. Análise morfométrica do intestino delgado de leitões com 24 horas de vida.....	85
Tabela 2. Análise morfométrica do intestino delgado de leitões com 28 dias de vida.....	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fig 1. Comparison of total IgG, IgM and IgA concentrations (mg/mL) in colostrum from gilts and sows in the first 3 hours after farrowing.....	47
Fig 2. Effect of sow parity and their colostrum on piglet serum immunoglobulins concentration (mg/mL) at 24 hours and 28 days after birth.....	48
Fig 3. Comparison of cytokines concentrations (pg/mL) in colostrum and serum from gilts and sows in the first 3 hours after farrowing.	50
Fig 4. Effect of sow parity and their colostrum on piglet serum cytokines concentration (pg/mL) at 24 hours after birth.	51
Fig 5. Comparative analysis of CFSE-based lymphocyte proliferation from PBMC in groups.	53
Fig 6. Analysis of CFSE-based lymphocyte proliferation..	54

CAPÍTULO II

Figura 1. Cálculo da relação vilos:cripta do duodeno (a), jejuno (b) e íleo (c) dos grupos com 1 e 28 dias de idade.....	87
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
APC	Célula apresentadora de antígenos / Aloficocianina
AV	Altura de vilosidade
BD	Becton Dickinson
CC	Células caliciformes
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
CO ₂	Dióxido de carbono
CS&T	<i>Cytometer Setup and Tracking</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Espessura de mucosa
EV	Espessura de vilosidade
FMO	<i>Fluorescence Minus One Control</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FTPI	Falha na transferência de imunidade passiva
GG	Piglets were kept with their own gilts and allowed to suckle as normal
GM-CFS	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMR	Piglets from gilt were isolated from the dams and kept in containers under temperature control
GS	Piglets were changed from gilts to sow and allowed to suckle as normal
HE	Hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon-gama

Igs	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
LL	Leitões nascidos das leitoas e que mamaram o colostro da leitoa
LP	Leitões nascidos das leitoas e que mamaram o colostro da porca
LS	Leitões nascidos das leitoas alimentado com um pó comercial substituto lácteo
mAbs	Anticorpos monoclonais
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Célula <i>natural killer</i>
OP	Ordem de parto
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina fosfatada tamponada (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	Profundidade de cripta
PE-Cy7	Ficoeritrina-Cianina 7
PerCP-Cy5	Proteína de clorofila peridinina-Cianina 5
PL	Leitões nascidos das porcas e que mamaram o colostro da leitoa
PP	Leitões nascidos das porcas e que mamaram o colostro da porca
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PS	Leitões nascidos das leitoas alimentado com um pó comercial substituto lácteo
RNA	Ácido ribonucleico
RPE	R-Ficoeritrina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino

SG	Piglets were changed from sow to gilt and allowed to suckle as normal
SI	Sistema Imune
SMR	Piglets from sow were isolated from the dams and kept in containers under temperature control
SPF	Livre de patógenos específicos (<i>Specific Pathogen Free</i>)
SS	Piglets were kept with their own sows and allowed to suckle as normal
SSC	<i>Side Scatter</i>
SWC	<i>Swine workshop cluster</i>
TCR	Receptor de células T
Th	Célula T auxiliar
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
κ	Kappa
λ	Lambda
<	Menor que
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
p/v	Peso/volume
pg	Picograma
%	Porcentagem
+	Positivo
U	Unidades
x	Vezes
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.1.1 Objetivos Específicos	21
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1. Hiperprolifividade das matrizes	21
3.2 Ontogenia imunológica	22
3.2.1 Linfoblastia de células T	23
3.3 Transferência de imunidade passiva e Ingestão de colostro	25
3.4 Produção de colostro	25
3.5 Composição do colostro	26
3.5.1 Imunoglobulinas (Igs)	28
3.5.2 Componentes celulares	29
3.6 Fatores que afetam a produção de colostro pela fêmea	30
3.7 Fatores que afetam a ingestão de colostro pelo leitão	31
3.8 Maturação intestinal	32
3.9 Alternativas para minimizar a falha na transferência de imunidade passiva	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
5. CAPITULO I	42
6. CAPITULO II	78

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema imune (SI) fetal em suíno ocorre quase na sua totalidade durante a gestação. O SI parece ser um dos sistemas que têm atividade mínima até o nascimento, uma vez que até esta fase, o feto estará protegido da estimulação antigênica de organismos patogênicos com os quais nunca teve contato em função da característica epiteliochorial difusa da placenta suína. Portanto, durante a gestação o leitão permanece em um ambiente estéril, impermeável e protetor oferecido pelo útero (Salmon et al., 2009). Após o parto, o leitão neonato passa de um ambiente intrauterino estéril a um ambiente externo rico em antígenos e agentes patogênicos, necessitando de uma resposta imune adequada para sobreviver (Le Dividich et al., 2005). Por consequência da estrutura placentária o feto não recebe imunoglobulinas maternas durante o período gestacional, sendo assim, o leitão é agammaglobulêmico ao nascimento tornando-o imunocomprometido nas primeiras semanas de vida (Kim, 1975; Salmon et al., 2009).

Durante a vida intrauterina, ou seja, durante o período de gestação, a partir dos 70 dias (Sobestianski et al., 2007), o feto é capaz de responder à estimulação antigênica num período relativamente precoce do seu desenvolvimento. Entretanto, o ambiente uterino no suíno é praticamente estéril não havendo, normalmente, estimulação antigênica, o que faz com que não haja produção de anticorpos pelo feto (Salmon et al., 2009).

A atividade do sistema imune pode ter o início disparado por eventos durante o parto, pelo colostro e pelo ambiente, visando promover proteção contra moléculas estranhas e microrganismos que estão iniciando sua colonização e desafiando o animal (McCauley & Hartmann, 1984). De fato, as primeiras quatro semanas de vida dos leitões representam um período crítico em que esses animais apresentam maior susceptibilidade às doenças. Muitos fatores contribuem para essa situação, dentre os quais se destaca a imaturidade do sistema imune do leitão recém-nascido. Pois não são capazes de desenvolverem uma resposta imune satisfatória, já que ainda apresentam uma imaturidade funcional imunológica e do tempo necessário para a geração de imunidade humoral e celular (Pomorska-Mol et al., 2010; Salmon et al., 2009). Portanto, os componentes do sistema imune não estão completamente funcionais no leitão recém-nascido, sendo necessárias algumas semanas de vida para que o seu sistema imune esteja maduro (Rooke & Bland, 2002).

As células envolvidas com os mecanismos de imunidade inata e específica são originadas de uma mesma célula tronco hematopoiética pluripotente (Giguere & Polkes, 2005). Mesmo assim, quando comparado ao adulto, o leitão é considerado imunocomprometido. Vários fatores contribuem para este fato: um menor número de leucócitos e de células apresentadoras de antígenos (APC) e conseqüentemente, a baixa expressão de complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II); a redução na proporção de linfócitos pós-parto e o incompleto desenvolvimento do baço; a elevada concentração de cortisol e a reduzida concentração de linfócitos B no sangue do leitão. Os elevados níveis de cortisol no sangue suprimem a função imune e interferem na dinâmica dos leucócitos. Sua produção está relacionada ao início do parto e ao estresse do nascimento. Quanto aos linfócitos B, a quantidade destes ao nascimento é menor que os níveis encontrados nos suínos adultos, permanecendo desta forma até os 10 dias de idade e atingindo os níveis de um adulto em um período de cinco semanas (McCauley & Hartmann, 1984). Essa condição de imunodeficiência dificulta o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa após experiências prévias com patógenos e uma limitada ativação dos fagócitos e sua entrada nos tecidos, tornando-os susceptíveis aos agentes causadores de infecção durante a fase pré-desmame do leitão.

Ademais, a natureza epiteliocorial da placenta suína impermeabiliza à transferência de imunoglobulinas (Igs) maternas aos conceptos, e para adquirir uma proteção imunológica e garantir a sobrevivência; a imunidade nas primeiras semanas de vida vai depender, na sua totalidade, da ingestão de Igs veiculadas pelo colostro (Rooke & Bland, 2002; Salmon et al., 2009). Além de fornecer proteção imunológica, o colostro também é fonte de nutrientes, compostos bioativos e gordura que fornece energia essencial para sua termorregulação (Rooke & Bland, 2002).

O período de absorção das Igs pelo leitão ocorre nas primeiras horas após o nascimento e pode se estender até 36 horas após parto. A absorção se dá via intestinal pela endocitose de macromoléculas após a ingestão de colostro (Rumbo et al., 1998). Outro fator que favorece as células intestinais na absorção de proteínas são as *tight junctions* (junções estreitas) que são um complexo de proteínas transmembranares e citoplasmáticas capazes de cruzar a bicamada lipídica e se ligam a porção extracelular da célula adjacente, atuando como uma barreira seletiva do intestino e favorecendo função de barreira epitelial intestinal (Podolsky, 1999).

O colostro contém uma série de constituintes que atuam direta e indiretamente na função imunológica do leitão, as Igs são as mais presentes no colostro, e fornecem

proteção direta contra antígenos. As que estão presentes em maior quantidade no colostro são imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina M (IgM), respectivamente. A concentração de IgG no colostro é várias vezes maior do que no plasma da porca e declina exponencialmente nas primeiras 24 horas após o parto (Le Dividich et al., 2005).

O colostro contém células leucocitárias como: linfócitos, macrófagos, neutrófilos, citocinas que exercem efeito imunoestimulante sobre a resposta imune dos mitógenos (Williams, 1993). Os linfócitos estão em torno de 26% das células encontradas no colostro suíno (Evans et al., 1982). As citocinas compõem fatores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF- α , fatores anti-inflamatórios como a IL-10, respostas do tipo Th1 (IL-12 e TNF- α) e Th2 (IL-6, IL-10 e IL-4) (Nguyen et al., 2007).

A quantidade mínima de colostro necessária para que um leitão absorva Igs suficientes para o seu desenvolvimento varia de 250g a 300g nas primeiras 24 horas após o nascimento (Devillers et al., 2007; Quesnel, 2011). O consumo de colostro pelos neonatos é muito variável, entre 15% a 110% na mesma leitegada (Le Dividich et al., 2005), sendo influenciado por fatores maternos, como a quantidade e a qualidade de colostro produzido pela fêmea, e também relacionado ao tamanho da leitegada, peso ao nascimento e vitalidade do neonato (Quesnel, 2011).

Logo após o parto, os neonatos são capazes de dar início a respostas imunitárias devido à estimulação antigênica a que são expostos imediatamente no meio exterior. Contudo, qualquer resposta imunitária num animal recém-nascido é uma resposta primária e, portanto, com aparecimento demorado e com baixa produção de anticorpos (Salmon et al., 2009). Esta resposta primária requer, aproximadamente, duas semanas para conferir proteção contra agentes infecciosos. Este despreparo imunológico do leitão ao nascimento e o impedimento da transferência de Igs da mãe para os fetos via placenta, faz com que ele seja extremamente dependente da aquisição de imunidade passiva transferida pela mãe, via colostro. Neste período, a assistência materna é fundamental a sobrevivência do leitão, e a ingestão de colostro é determinante durante este intervalo de tempo entre a exposição a microrganismos patogênicos e o desenvolvimento de resposta imunitária efetiva (Giguere & Polkes, 2005). Uma vez que a imunidade seja conferida pela ingestão de Igs colostrais (anticorpos), leucócitos e outros fatores de imunidade são também adquiridos e podem contribuir para imunidade do leitão recém-nascido (Forner et al., 2021).

A falha na transferência de imunidade passiva (FTPI) da porca para o leitão, ocorre por falta de ingestão ou ingestão insuficiente de colostro nas primeiras 24 horas após o nascimento. Dessa forma o recém-nascido, por não apresentar defesas imunológicas eficientes, torna-se mais suscetível ao desenvolvimento de doenças infecciosas (Raidal et al., 2005). O manejo do colostro tem adquirido nos últimos anos bastante relevância a medida em que houve aumento na prolificidade das matrizes. A elevação no número de nascidos acarreta uma maior competição pelas tetas, ocasionando uma ingestão desigual pelos leitões ampliando a proporção de animais não protegidos nas fases de creche e recria (Quesnel et al., 2012).

Para evitar a FTPI tem se usado alternativas, tais como: equalização da leitegada através de mães adotivas, que consiste na transferência de leitões excedentes de uma fêmea para outra (Furtado et al., 2012); e o aleitamento artificial com substituto do leite como forma de suplementar a baixa produção de colostro e leite pelas fêmeas. Existe ainda a possibilidade e alternativa de utilizar colostro bovino (Jensen et al., 2001). Quando a FTPI é diagnosticada precocemente, deve recorrer-se à administração de colostro por via oral. O colostro deve ser administrado nas primeiras 4 a 6 horas de vida.

Estudos mostram que em leitões alimentados com sucedâneo e/ou substituto do leite, assim privados de colostro da porca, não ocorre a transferência de imunidade passiva para o recém-nascido, visto que o substituto do leite não contém imunoglobulinas maternas, e em consequência disso não ocorre a transferência de imunidade passiva via colostro; além disso, as dietas artificiais parecem menos eficientes que o colostro na estimulação do crescimento e função intestinal em leitões recém-nascidos (Jensen et al., 2001).

Sabendo que se tem poucos estudos relacionados a avaliação das citocinas no colostro da fêmea suína e como elas atuam na modulação imunológica do leitão recém nascido, bem como a influencia na pariedade na concentração citocinas no colostro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do colostro de leitoas, porcas e substituto do colostro na ontogênese imunológica e na maturação intestinal do leitão.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Mensurar e comparar as concentrações de imunoglobulinas totais, IgA, IgM e IgG do colostro das fêmeas e do soro dos leitões.
- Quantificar as citocinas no soro dos leitões que receberam fontes diferentes de colostro, bem como no soro e colostro das fêmeas;
- Avaliar a influência do colostro na ontogênese imunológica do suíno através das células obtidas de sangue, baço, timo e linfonodos;
- Imunofenotipar as células obtidas de sangue, baço e linfonodos dos leitões que receberam diferentes fontes de colostro;
- Avaliar a influência do colostro na maturação do intestino delgado dos leitões;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Hiperprolificidade das matrizes

A produção moderna de suínos objetivou a seleção genética baseada em prolificidade, o que está associado a taxa de ovulação da fêmea, a taxa de fertilização dos oócitos e à sobrevivência dos embriões e fetos até o nascimento permitindo leitegadas maiores (Bjorkman et al., 2017; Kemp et al., 2018), com média de 13,5 nascidos vivos por fêmea resultando em 28,9 desmamados/fêmea/ano (Bittencourt, C. G 2020). Contudo a produção de colostro não aumentou para suprir a necessidade dos leitões. Um estudo realizado por Quesnel et al. (2012) estimou que pelo menos um terço das porcas não produzem colostro suficiente para atender às necessidades da sua leitegada.

A prolificidade das fêmeas aumentou a quantidade de nascidos, porém gerou redução do peso do leitão ao nascimento. Isso se deu por um espaço reduzido dentro do útero e devido a desuniformidade da leitegada ocorre um aumento na mortalidade neonatal (Douglas et al., 2013). Leitões com baixo peso ao nascer apresentam crescimento retardado e baixo desempenho, portanto o peso é um fator crítico para o desenvolvimento e sobrevivência do leitão (Fix et al., 2010). O baixo peso está relacionado a baixas reservas de gordura corporal, e por isso os leitões não produzem calor suficiente para sua termorregulação e estão mais susceptíveis ao frio, e conseqüentemente levam mais tempo para realizar a primeira mamada e tem pouca eficiência na competição pelas tetas (Herpin et al., 2002; Lay et al., 2008). Segundo Quiniou et al. (2002), os leitões com menos de 1kg ao nascimento possuem menor chance de sobrevivência.

Considerando que a produção de colostro é independente do tamanho da ninhada, então quando ocorre aumento do número de nascidos, diminui a ingestão de colostro (Declerck et al., 2015; Foisnet et al., 2010; Quesnel et al., 2012), e conseqüentemente se a leitegada for grande, aumentará a competição por tetas (Milligan et al., 2001).

A mortalidade em leitões continua sendo um grande problema na suinocultura visto que a taxa de mortalidade pré-desmame é de 20% (Devillers et al., 2011). Uma das principais causas de mortalidade neonatal é a ingestão insuficiente de colostro (Edwards, 2002) considerando que 50% da mortalidade pré-desmame ocorre nos primeiros três dias após o nascimento (Tuchscherer et al., 2000).

Dentre as principais causas de mortalidade no período de maternidade está a inanição (14%) que é a consequência da falta de ingestão de colostro e/ou leite, bem como a ingestão insuficiente, levando a uma hipotermia e podendo levar a outros agravantes como o esmagamento (7%) e diarreia (5%) (Fix et al., 2010; KilBride et al., 2012). O peso também influencia nas próximas fases do desenvolvimento do suíno, demonstrando que leitões mais pesados ao nascimento serão mais pesados no desmame e conseqüentemente até o final do ciclo produtivo. Estudos mostram que leitões com até 900 g de peso ao nascer quando comparados a leitões com peso de 2,1 kg, apresentaram 3 kg a menos no peso ao desmame (Furtado et al., 2012). Quiniou et al., (2002) demonstraram que a diferença de peso entre o leitão mais leve e o mais pesado foi de 5,4 kg ao desmame e 1,9 kg aos 63 dias de idade, mostrando um efeito multiplicador de peso.

Os leitões de baixo peso apresentam mais complicações em relação a termorregulação (Herpin et al., 2002), ingestão de colostro (Devillers et al., 2011) e como consequência afeta também a sobrevivência (Quiniou et al., 2002). No entanto, estes leitões menores podem ter mais chances de sobrevivência se receberem uma assistência especial como auxílio na primeira mamada e com fornecimento de colostro de forma individualizada (Heck, 2007).

3.2 Ontogenia imunológica

O sistema imune origina ainda na fase intrauterina, e a hematopoese ocorre em três locais diferentes. Inicialmente o primeiro órgão linfóide é o saco vitelínico, onde ocorre o surgimento das células-tronco, seguindo para o fígado fetal, onde são produzidas; seguem para o timo para seguir no processo de diferenciação, e em torno de 40 dias de gestação podem ser detectadas no timo, onde são chamadas de timócitos duplo negativos

(DN) (Sinkora et al., 2000; Sinkora et al., 2003). O timo é dividido em duas porções: o córtex e a medula, sendo que a maturação e seleção de linfócitos T ocorre no córtex, onde as células hematopoiéticas se diferenciam em células progenitoras linfóides que darão origem aos linfócitos B, T e células NK; e as células progenitoras mielóides que originarão os eritrócitos e as células brancas do sangue (Sinkora & Butler, 2016). As células T suínas diferenciam-se pela expressão do marcador molecular CD3 em aproximadamente 40 a 50 dias de gestação. Após, se inicia a diferenciação para CD4 e CD8 duplo positivos e se tornam predominantes entre os 60-90 dias de gestação (Sinkora et al., 1998; Sinkora & Butler, 2016; Sinkora et al., 2000; Sinkora et al., 2007; Sinkora et al., 2003).

O processo de seleção negativa e positiva dos timócitos não está bem esclarecido, podendo acontecer no segundo e terceiro trimestre de gestação, visto que neste período há uma intensa morte de timócitos (Sinkora & Butler, 2016). De forma geral, a seleção positiva permite a sobrevivência das células T que expressam TCR capazes de reconhecer o MHC das próprias células, enquanto a seleção negativa elimina as células que se ligam fortemente ao MHC próprio, sendo um fator importante para determinação de autotolerância (Sinkora et al., 1998; Sinkora & Butler, 2016; Sinkora et al., 2007).

Após o nascimento, a medula óssea assume a produção de linfócitos e o timo começa a sua involução. Em leitões neonatos que tiveram o timo removido, ocorre uma queda no número de linfócitos T no sangue nos primeiros três meses, em seguida se inicia um aumento, sugerindo que o timo é o principal local de produção, mas que após o nascimento outros tecidos linfóides podem produzir os linfócitos T (Licence & Binns, 1995), como as placas de Peyer, nódulos linfático e nódulos intra epitelial do trato gastrointestinal, uma vez que foram encontradas células mitóticas nesses tecidos (Thielke et al., 2003).

Durante as primeiras semanas de vida, o sistema imunológico está progredindo rapidamente sob o escudo da imunidade materna (Salmon et al., 2009). Os órgãos linfóides são os principais componentes do sistema imunológico e seu desenvolvimento e maturação desempenham um papel importante neste processo.

3.2.1 Linfoblastia de células T

Os linfócitos T, além de CD3, expressam também linhagem α/β ou γ/δ . No caso de suínos, a maior população de células expressam receptores gama/delta no terceiro

trimestre de gestação, no entanto no final da gestação a proporção de linfócitos T α/β tende a aumentar em relação aos linfócitos T γ/δ (Sinkora et al., 1998). Estudos mostram que as células T γ/δ levam em torno de três dias para expressar o TCR, enquanto os timócitos T α/β levam cerca de 15-20 dias. Assim sugere-se que as células T γ/δ não passam por um processo tão rigoroso de seleção quanto as células T α/β (Sinkora et al., 2000) e que a maturação e a alteração fenotípica ocorre após a expressão de TCR γ/δ (Sinkora et al., 2007).

As células T migram do timo para a circulação onde podem ser divididas em dois: CD8⁺ é expresso em linfócitos T citotóxicos e células *Natural Killer* (NK). Linfócitos T CD4⁺ são expressos em linfócitos T helper e linfócitos T reguladores. Ambos marcadores atuam auxiliando o TCR na interação com a célula apresentadora de antígeno (APC). Em suínos, os linfócitos T que são duplamente positivos para CD4 e CD8, e estão envolvidos com a resposta efetora e de memória (Zuckermann & Husmann, 1996).

Os linfócitos T CD4⁺CD8⁻ são consideradas células Th virgens, elas reconhecem antígenos por meio do MHC classe II, e ocorre a proliferação e expressão de CD8 na superfície da célula. As células T CD4⁺CD8⁻ expressam fenótipo de memória. Elas reconhecem antígenos mesmo depois da primeira exposição pelo produção interleucina 2 (IL-2), produção de citocinas e interferon alfa (IFN- α) e estimulação de produção de anticorpos pelas células B (Zuckermann & Husmann, 1996).

Os linfócitos T CD4⁻ CD8⁺ são chamados de citolíticos, e reconhecem antígenos MHC classe I e respondem estimulando a expressão de CD25, a secreção de citocinas, como IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) matando a célula alvo (Laval et al., 2002; Piriou et al., 2003; Sipos et al., 2003).

O baço é responsável por filtrar e aprisionar antígenos presentes na circulação sanguínea, o sangue chega até o baço pela artéria esplênica. Existem dois compartimentos com funções diferentes: a polpa vermelha é responsável pelo controle celular dos eritrócitos, em que as células velhas ou defeituosas são mortas e removidas da circulação. Na polpa branca estão os linfócitos T e B. Os antígenos do sangue ficam retidos na zona marginal, então as células dendríticas capturam e apresentam para o linfócito Th combinado com o MHC classe II. A partir disso, a célula B é ativada e ocorre multiplicação nos centros germinativos dos folículos primários da zona marginal (Sinkora & Butler, 2016).

3.3 Transferência de imunidade passiva e Ingestão de colostro

Na espécie suína assim como em outros animais ungulados, como bovinos e ovinos, não ocorre a transferência de anticorpos via transplacentária durante a gestação. A característica placentária do tipo epiteliocorial difusa, possuiu seis camadas teciduais entre a mãe e feto impermeabiliza a passagem de anticorpos maternos para a prole durante a gestação (Le Dividich et al., 2005; Salmon et al., 2009); em consequência disso o leitão é agammaglobulinêmico ao nascimento (Kim, 1975; Sangild et al., 1999). Desta maneira, são incapazes de produzir suas próprias respostas imunes que os protegem dos desafios contra os patógenos do seu novo ambiente.

Como a transferência de imunidade materna na espécie suína ocorre exclusivamente de forma passiva via ingestão de colostro pelo neonato após o nascimento, sendo assim a quantidade mínima de colostro necessária para que um leitão absorva imunoglobulinas suficiente para o seu desenvolvimento varia de 200g a 300g nas primeiras 24 horas de vida (Devillers et al., 2007; Devillers et al., 2011; Quesnel, 2011) ou 180 g/kg de peso ao nascer (Quesnel, 2011). Essa quantidade é sugerida para garantir uma adequada transferência de imunidade passiva materna e consequentemente reduzir a mortalidade pré-desmame, já que a taxa de mortalidade pré-desmame diminui à medida que o consumo de colostro aumenta (Quesnel et al., 2012).

A quantidade de colostro para assegurar a sobrevivência pode variar de acordo com o peso do nascimento dos leitões. Desta maneira, a ingestão de 200g de colostro por leitão pode garantir a transferência de anticorpos maternos e reduz o risco de morte pré-desmame (Devillers et al., 2007), enquanto a ingestão de 250g de colostro por leitão nas primeiras 24 horas assegura o status sanitário e ganho de peso na fase pré e pós-desmame (Ferrari et al., 2014; Quesnel et al., 2012). Para tanto, as porcas que amamentam em média 13 leitões, no primeiro dia pós-parto precisam produzir um mínimo de 3,25kg de colostro (Quesnel et al., 2012).

3.4 Produção de colostro

O colostro constitui um fluído secretado na glândula mamária durante os últimos dias da gestação e nos primeiros dias pós-parto. Esse fluído é a primeira secreção da glândula mamária e após o parto é a principal fonte de proteção imunológica para o

recém-nascido. Uma série de constituintes que atuam direta e indiretamente na função imunológica do leitão, como as Igs, fazem parte da composição do colostro (Quesnel et al., 2012). Além das Igs, o colostro é rico em proteínas, gordura, açúcares e compostos bioativos, como células de defesa e citocinas, servindo de fonte nutricional ao recém-nascido e regulando funções biológicas (Danielsen et al., 2011; Farmer & Quesnel, 2009; Quesnel et al., 2012). Desta maneira, o colostro é uma grande fonte de energia para os leitões recém-nascidos, como também participa do desenvolvimento da imunocompetência através da transferência de imunoglobulina materna para a prole.

A lactogênese nos suínos é ativada no final da gestação, por volta dos 100 dias de gestação (Farmer & Quesnel, 2009; Kensinger et al., 1982; Palombo et al., 2018). É composta por duas fases: a lactogênese I em que ocorre a produção de colostro e a lactogênese II que corresponde a produção de leite, e se mantém pelo estímulo da mamada ou ordenha, nessa fase aumenta a taxa de gordura e a concentração de lactose (Farmer & Quesnel, 2009; Farmer et al., 1998). O período de transição entre a lactogênese I e II se inicia entre seis a dois dias antes do parto, isso se dá pela regulação ampla de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, proteínas e de lipídios, bem como pela influência hormonal e imunológica (Palombo et al., 2018).

Durante a colostrogênese as junções entre as células epiteliais da glândula mamária aumentam a permeabilidade, para que componentes do plasma materno adentrem os alvéolos mamários, tais como hormônios, fatores de crescimento e imunoglobulinas, sendo que a imunoglobulina G (IgG) migra para a glândula mamária por um mecanismo mediado por receptor FcRn (Schnulle & Hurley, 2003). Diversos estudos mostram diferentes quantidades de colostro produzido, demonstrando sua grande variabilidade, ficando em torno de 1,5 kg a 8,5kg, com média de 3,32 kg (Devillers et al., 2007; Quesnel, 2011; Vadmand et al., 2015).

3.5 Composição do colostro

O colostro é rico em Igs, proteínas, carboidratos e gordura, sendo uma fonte energética ao leitão recém-nascido que apresenta baixas reservas de energia, a gordura fornece de 40 a 60% da energia total para a sua exigência (Le Dividich et al., 2005). Possui também alguns microminerais, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento, e menor concentração de lactose, quando comparado com o leite (Hurley & Theil, 2011). A composição do colostro muda rapidamente após o parto, sendo substituído pelo leite

normal após decorrido 12 a 24 horas (Quesnel et al., 2012; Theil et al., 2014). Teores de gordura e lactose aumentam, enquanto a proteína diminuiu pelo fato da diminuição das concentrações de IgG e IgA (Theil et al., 2014).

O colostro suíno e de outras espécies é conhecida pela sua grande concentração de Igs, mas também é fonte de nutrientes e contém substâncias com atividade antimicrobiana não específica e/ou imunomoduladoras, incluindo a lactoferrina, transferrina, lisozima, lactoperoxidase, citocinas livres, quimiocinas, complemento, lipídeos, carboidratos, macromoléculas não imunoglobulina, fatores de crescimento epitelial (IGF-1, IGF-2, EGF e TGF- β) e proteínas de ligação (Donovan et al., 1994; Jaeger et al., 1987; Labeta et al., 2000; LeBouder et al., 2003; Odle et al., 1996; Xu et al., 1999). A haptoglobina presente no colostro é uma proteína de fase aguda com função na modulação imunológica do sistema inato e adaptativo de leitões (Hurley & Theil, 2011; Lai et al., 2009), já a lactoferrina favorece o metabolismo do ferro e também apresenta função antimicrobiana (Hurley & Theil, 2011). Os fatores de crescimento afetam o crescimento e diferenciação de células epiteliais intestinais, limitando a penetração de patógenos (Xu et al., 2000). Diversos agentes imunomoduladores são encontrados no colostro, tais como hormônios (prolactina, estradiol, progesterona, estrona, somatotropina e insulina), anticorpos anti-idiotípicos e nucleotídeos que aumentam a atividade de células NK, macrófagos, células T auxiliares e citocinas. Dentre as citocinas presentes incluem fatores pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), fatores anti-inflamatórios (TGF- β e IL-10), promotores de crescimento (eritropoietina, G-CSF e M-CSF), quimiocinas (IL-8 / CXCL-8 e CCL5), agentes que promovem respostas imune do tipo Th1 (IFN- γ e IL-12) e do tipo Th2 (IL-6, IL-4 e IL-10) e Th3 (TGF- β 1) (Nguyen et al., 2007). Os resultados *in vitro* sugerem que as duas citocinas lactogênicas predominantes (TGF- β 1 e IL-4) estão envolvidas em respostas IgA induzindo resposta do tipo Th2 e diminuindo a capacidade de resposta imunológica dos neonatos (Nguyen et al., 2007).

As citocinas são proteínas secretadas tanto por células que participam da resposta imune inata como da resposta imune adaptativa. Elas atuam e produzem uma cascata de efeitos combinatórios que contribuem para a organização, desenvolvimento e funcionamento do sistema imune. Existem dificuldades na quantificação e estudos da ação das citocinas na glândula mamária, por não saber ao certo se estas proteínas são secretadas pela própria glândula, pelos leucócitos presentes no colostro ou por ambos.

3.5.1 Imunoglobulinas (Igs)

As Igs representam cerca de 80% da proteína total do colostro, fornecendo proteção direta contra antígenos, pois são anticorpos prontos advindos da imunidade materna. O isotipo IgG é a imunoglobulina predominante, representando cerca de 75% das Igs, já a imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina M (IgM) estão presentes em menores quantidades (Klobasa & Butler, 1987). De forma contrária, no leite IgA é a imunoglobulina predominante, concordante com a necessidade de proteção da mucosa intestinal, uma vez que a absorção de Igs cessa após algumas horas (Le Dividich et al., 2005; Rooke & Bland, 2002).

IgA pode estar presente na sua forma monomérica, dimérica e em menor quantidade na forma secretória (sIgA) (Salmon et al., 2009). A IgG é transferida do sangue materno para as secreções mamárias sob regulação de hormônios produzidos na gestação, resultando na diminuição dos níveis séricos da mesma durante as primeiras 24 horas de secreção, sendo que a transição entre colostro e leite ocorre dentro de um a dois dias pós parto (Salmon et al., 2009) (Butler et al., 2006; Farmer & Quesnel, 2009; Le Dividich et al., 2005; Wagstrom et al., 2000). A concentração de IgG no colostro tem variação individual, tanto na concentração inicial quanto na taxa de declínio nas 24 horas pós-parto (Le Dividich et al., 2005). Devillers et al. (2011) relatam uma redução de até 20% da concentração de IgG em quatro horas após o parto, por isso se o parto for muito longo (> 5 horas), os últimos leitões que nascem podem ingerir colostro com menos Igs maternas. Mesmo que as fêmeas sejam criadas sob o mesmo manejo e apresentem a mesma linhagem genética, a concentração de IgG e a quantidade de colostro produzido pela matriz suína apresenta uma grande variação individual (Devillers et al., 2007).

As Igs são absorvidas por meio de endocitose dos enterócitos e vão para o sistema linfático intestinal, posteriormente a IgA é enviada para as superfícies mucosas, enquanto IgG permanece na circulação (Butler, 1998). A concentração de IgG no colostro tende a diminuir nas primeiras horas após o parto, de acordo com a concentração de IgG diminuiu 30% nas seis horas após o parto. Neste sentido, um outro estudo realizado por Quesnel (2011) demonstrou que em 15% das porcas a concentração de IgG diminuiu 50% em 24 horas pós-parto. As estimativas da proporção de IgA para IgG variam de 0,16 a 0,22 no colostro e de 2,1 a 6,96 no leite (Butler, 1998); portanto, a concentração de IgG no

colostro é maior do que no plasma da porca e declina exponencialmente nas primeiras 24 horas após o parto (Le Dividich et al., 2005).

3.5.2 Componentes celulares

Como mencionado anteriormente, as Igs não são as únicas fontes de imunidade passiva da porca para os leitões, os leucócitos também representam uma fonte importante de imunidade celular para os neonatos. A concentração de leucócitos no colostro é de 1×10^7 células/mL e de 1×10^6 células/mL no leite (Evans et al., 1982). A população de leucócitos é composta principalmente por neutrófilos (40%), seguidos por linfócitos T (30%), linfócitos B (16%) e macrófagos (11%) e células NK (Forner et al., 2021), mas que pode variar o número e o tipo de célula de acordo com o estágio de desenvolvimento da glândula mamária e de outras condições individuais (Magnusson et al., 1991). Os neutrófilos têm função de depurar patógenos extracelulares e atuam nas respostas agudas, também atuam nas funções efetoras de células imunes inatas e adaptativas (Hoebe et al., 2004).

Das células encontradas no colostro, em média 26-30% são linfócitos, sendo que a maior parte desses linfócitos são células T (Evans et al., 1982; Forner et al., 2021), conseqüentemente as células B são encontradas em menor número (Forner et al., 2021; Schollenberger et al., 1986). Os linfócitos T $CD3^+$ são a população de linfócitos mais presentes no colostro, apresentam marcadores fenotípicos diferentes daqueles encontrados no sangue periférico. Essa população de linfócitos é estimulada *in vitro* por antígenos virais e bacterianos (Lejan, 1994; Pomorska-Mol et al., 2010). Os linfócitos T são compostos de subconjuntos auxiliares e citotóxicos, onde se destaca o $TCD3^+ CD8^+$ que fornecem mediadores inflamatórios por meio das citocinas (Forner et al., 2021; Hlavova et al., 2014; Pomorska-Mol et al., 2010). A subpopulação de linfócitos T no colostro apresenta ainda fenótipos de memória central e de memória efetora que fornece proteção ao neonato por meio da experiência imunológica anterior da porca (Forner et al., 2021).

A imunidade mediada por células foi detectada somente em leitões que permaneceram com a mãe por mais de 12 horas de vida, isso indica que a absorção de imunidade celular do colostro se dá somente em filhotes biológicos, sendo mais um forte indicativo de que o leitão deve permanecer com a mãe por pelo menos 12 horas após o

nascimento, dessa forma otimizando a transferência de imunidade materna (Bandrick et al., 2014).

3.6 Fatores que afetam a produção de colostro pela fêmea

No suíno, a produção de colostro começa pouco tempo antes do parto e torna-se contínua durante o parto até 12-24 horas após o parto (Quesnel et al., 2012), quando a composição é alterada e se dá o início da produção de leite. Vários fatores interferem na produção de colostro pela matriz suína, tais como a presença de glândulas mamárias pouco desenvolvidas ao parto (Hurley & Theil, 2011), período gestacional (partos prematuros) (Milon et al., 1983), hormônios sexuais (Devillers et al., 2004), fêmeas em estado catabólico nos últimos dias de gestação (Decaluwe et al., 2013), a nutrição da fêmea pode atuar no desenvolvimento da glândula mamária, e os mecanismos hormonais e fisiopatológicos que podem controlar a secreção de colostro no final da gestação (Quesnel et al., 2015), entre outros. A influência da ordem de parto na produção do colostro ainda é controversa (Devillers et al., 2007; Ferrari et al., 2014; Quesnel, 2011). Alguns autores relatam que as porcas multíparas tendem a produzir mais colostro em relação às fêmeas primíparas (Ferrari, Sbardella et al. 2014), e as fêmeas de segunda e terceira ordem de parto produzem mais colostro do que leitoas e porcas velhas (ordem de parto >7) (Devillers, Farmer et al. 2007).

A concentração de IgG no colostro da porca é 5% superior à do colostro da leitoa. Leitões que ingerem colostro de fêmea multípara apresentam variação 10% concentração de IgG no soro, explicada pela concentração de IgG no colostro (6%) e pela ordem de nascimento (4%) (Cabrera et al., 2012). Quesnel (2011) demonstrou que não houve influência da paridade na concentração de IgG no momento do parto, mas que 24 horas após o parto houve uma diminuição significativa nas fêmeas de primeiro parto. Outros estudos demonstram que porcas de terceira e quarta paridade apresentaram níveis de IgG superiores comparadas às porcas primíparas (Carney-Hinkle et al., 2013; Forner et al., 2021).

Sabe-se também que fêmeas multíparas produzem mais colostro em comparação com fêmeas primíparas, pois apresentam maiores concentrações de Igs e células imunes, que se explicam pelo fato de que porcas multíparas têm uma experiência imunológica maior (Cabrera et al., 2012; Devillers et al., 2007; Devillers et al., 2004; Forner et al., 2021)

As células imunes presentes no colostro também são influenciadas pela paridade. Linfócitos T CD3⁺ é segunda população de células mais abundante no colostro, e apresenta diferenças significativas de acordo com a ordem de parto. As fêmeas múltiparas apresentam maiores concentrações de fenótipos de memória central, (TCD3⁺CD4⁺CD27⁺CD45RA⁻) e memória efetora (TCD3⁺CD4⁺CD27⁻CD45RA⁻), isso se explica pelo fato de que a fêmea múltipara tem experiência imunológica maior pela maior exposição a antígenos do que as marrãs (Forner et al., 2021).

Fatores hormonais também são importantes na colostrogênese, como a prolactina, que é fundamental na produção de colostro, e aumenta suas concentrações próximo ao parto em resposta a queda nas concentrações de progesterona (Farmer et al., 1998). Em fêmeas primíparas pode ocorrer atraso na redução de progesterona e não ocorre o aumento de prolactina estando associado com a diminuição na produção de colostro (Foisnet et al., 2010). Estudo mais recente avaliou que a produção de colostro está relacionada com a proporção de prolactina:progesterona no pré-parto, sendo que as leitoas que apresentavam maior concentração de prolactina em relação a progesterona, nos últimos dois dias pré-parto, produziram 0,6 kg de colostro a mais do que leitoas que tiveram baixa prolactina no pré-parto (Loisel et al., 2015).

3.7 Fatores que afetam a ingestão de colostro pelo leitão

A vitalidade ao nascimento influencia diretamente a ingestão de colostro pelos leitões e o peso reduzido ao nascer está altamente correlacionado com a mortalidade pré-desmame e ao crescimento retardado, que por sua vez estão associados à ingestão ineficiente do colostro (Devillers et al., 2011; Quesnel et al., 2012). A produção de colostro deve ser em quantidades suficientes para suprir as necessidades de sua leitegada. O tamanho e peso da leitegada não influencia a produção de colostro, porém em leitegadas maiores (linhagens prolíficas), a disponibilidade de colostro por leitão, em uma base individual, é menor (Devillers et al., 2007).

Falhas na transferência de imunidade passiva aos leitões levam à morte pela subnutrição e por hipotermia, e aumentam a susceptibilidade às infecções ao curto (pós-natal) e longo prazo (pós desmame) (Rooke & Bland, 2002). Maiores taxas de morbidade e mortalidade ocorrem em leitões na fase pré-desmame, que receberam uma inadequada quantidade de colostro, ou cuja concentração sérica de Igs seja menor que a padrão para a espécie. Embora a maioria das enfermidades infecciosas dos leitões recém-nascidos seja

causada por microorganismos patogênicos, outros microorganismos normalmente apatogênicos podem gerar danos significativos aos leitões pré-desmame com imunodeficiência.

3.8 Maturação intestinal

No período pós-natal o trato gastrointestinal passa por crescimento e maturação de forma imediata sendo que as substâncias bioativas presentes no colostro e no leite da porca são essenciais para este processo. As células intestinais são altamente vacuolizadas e permeáveis, devido a alta capacidade endocítica dos enterócitos imaturos, a absorção ocorre por meio de macro-pinocitose na porção proximal do intestino delgado sendo capazes de absorver macromoléculas, como as Igs. O período de permeabilidade é de até 24 a 36 horas pós-parto, que compreende o intervalo entre o nascimento e o fechamento do intestino, e os vacúolos desaparecem (Ekstrom et al., 1988; Rumbo et al., 1998).

As Igs do colostro são capturadas por pinocitose não específica e vacuolizadas nos enterócitos do intestino delgado do leitão recém-nascido, porém os enterócitos adultos (produzidos pós-natal) não são capazes de endocitar proteínas íntegras (Clarke & Hardy, 1971; Smith & Jarvis, 1978; Smith & Peacock, 1980). Os vacúolos passam pela membrana basolateral do enterócito e as Igs atingem a corrente sanguínea. O momento em que ocorre a passagem pela membrana basolateral ocorre o cessamento e não há mais transferência de imunoglobulina do trato intestinal para a circulação do leitão, processo conhecido como “fechamento do intestino” (Clarke & Hardy, 1971; Rooke & Bland, 2002). A concentração máxima de anticorpos no soro dos leitões ocorre de quatro a 12 horas após a primeira mamada, declinando rapidamente após este período para cerca de 50%, até tornar-se nula em 24-48 horas devido ao "fechamento do intestino". Fato que justifica a necessidade de viabilizar maior ingestão possível pelos leitões logo nas primeiras horas após o parto. A ingestão de nutrientes como glicose e lactose regula o “fechamento” do intestino que ocorre dentro de 24 horas pós-parto (Lecce, 1966; Rooke & Bland, 2002; Werhahn et al., 1981). Conclui-se, portanto, que os leitões podem receber a imunidade passiva nas primeiras 24 a 36 horas após o nascimento, sendo nula a absorção de imunoglobulina após 48 horas de vida; e que a maturação da organização biofísica e/ou bioquímica e a função das barreiras das mucosas em neonatos são aceleradas com a ingestão de leite materno em suínos.

O fechamento intestinal ocorre mais cedo em leitões que consomem sucedâneo, em torno de 10 a 12 horas após o nascimento. Pelo fato de que mesmo que o sucedâneo

induz o crescimento normal do intestino, apresentando altura da vilosidade e profundidade da cripta semelhante aos leitões alimentados com colostro; no entanto, leitões que recebem sucedâneo serão ineficientes no transporte de macromoléculas via intestinal; resultando em uma concentração de IgG sérico 14 vezes menor que os leitões que receberam colostro (Jensen et al., 2001).

O crescimento intestinal está associado ao estímulo que as proteínas do colostro e do leite operam na mucosa levando a proliferação intestinal e aumento na replicação do DNA. O jejuno é a porção que apresenta maior taxa de mitose, já iniciando no segundo dia de nascimento (Xu et al., 2000). Um estudo relatou que o intestino delgado de leitões aumentou seu peso total em 70%, sendo que disso foram 115% no peso da mucosa, 24% no comprimento, 24% em profundidade de cripta e 33% em altura de vilosidade, durante a primeira semana de vida. A ingestão de colostro permite um impulso no crescimento do intestino aumentando o dobro de seu peso e aumenta o comprimento em 30% nos primeiros três dias de nascimento (Xu et al., 1992).

O comprimento e a largura das vilosidades, a profundidade da cripta e a espessura da mucosa do intestino delgado aumentam do dia 0 ao dia 3, e diminui do dia 3 ao dia 14 após o nascimento (Skrzypek et al., 2005). A maturação e crescimento intestinal está relacionado diretamente com a ingestão de colostro e leite, visto que leitões alimentados com colostro apresentaram maior borda de mucosa e maior taxa de síntese de proteínas nas primeiras 24 horas de nascimento, comparados com leitões que foram restritos de colostro e alimentados com água (Zhang et al., 1998).

Após o nascimento, a microbiota intestinal passa a colonizar intensivamente com o desenvolvimento de um microbioma intestinal que afeta a função do intestino e a sanidade do animal (Siggers et al., 2007). A colonização microbiana influencia a criação do repertório de anticorpos (Butler et al., 2009). As células intestinais possuem padrões de reconhecimento de receptores (PRRs) que identificam patógenos e ativam várias cascatas levando a produção de diferentes citocinas e peptídeos antimicrobianos (AMPs), elementos fundamentais na proteção contra infecções gastrointestinais (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010). Os receptores *Toll-Like* (TLR) são um tipo de PRR expresso em células epiteliais e imunológicas que reconhecem estruturas bacterianas específicas e promovem sinalização e inflamação (Balachandran et al., 2015). Portanto, o estabelecimento da microbiota inicial ajuda a estimular o desenvolvimento do sistema imunológico no suíno recém-nascido.

A microbiota intestinal fornece muitas funções ao leitão, incluindo melhor aproveitamento de energia, capacidade de produção de ácidos graxos voláteis, produção vitamina K, fermentação da celulose e aumento da resistência contra bactérias patogênicas (Ren et al., 2012). A composição do microbioma intestinal é moldada por fatores externos; por exemplo, mudanças na dieta, adição de prebiótico, probióticos e uso de antimicrobianos (Pajarillo et al., 2014). A comunidade microbiana do intestino delgado é influenciada pela dieta, desta forma leitões que receberam substituto de leite apresentavam alta colonização de patógenos entéricos, principalmente do gênero *Enterobacteriaceae*, e apresentaram maior incidência de diarreia (Poulsen et al., 2017).

3.9 Alternativas para minimizar a falha na transferência de imunidade passiva

A adoção de leitões tem sido usada amplamente na indústria, tendo em vista o cenário atual em que a hiperprolificidade das fêmeas gerou leitegadas numerosas e que muitas vezes o número de tetos e a quantidade de leite são insuficientes para alimentar os leitões. Como alternativa para resolução do problema, inclui a utilização de mães de leite, que consiste em realocar leitões excedentes ao número de tetas funcionais que a matriz apresenta (Heim et al., 2012), manejo também utilizado quando a mãe está apresentando algum problema de saúde ou distúrbio na produção de leite. Esse manejo tem por finalidade equiparar o número de leitões entre as porcas e dessa forma equalizando a leitegada para que haja alimento para todos. Evidenciou-se que leitões adotados têm sobrevivência semelhante aos leitões biológicos quando a adoção for feita após 24 horas de nascimento (Li et al., 2012). Além de que a competição entre os leitões pela mamada é resolvida rapidamente após esse período (Heim et al., 2012).

A FTPI da porca para o leitão causa imunodeficiência nos leitões, levando à predisposição dos animais afetados para o desenvolvimento de doenças infecciosas (Raidal et al., 2005). O manejo do colostro tem adquirido nos últimos anos bastante relevância na medida em que houve aumento na prolificidade das matrizes. A elevação no número de nascidos acarreta uma maior competição pelas tetas, ocasionando uma desigual ingestão pelos leitões ampliando a proporção de animais não protegidos nas fases de creche e recria (Butler et al., 1981; Klobasa et al., 1986; Quesnel et al., 2015). Quando a FTPI é diagnosticada precocemente, deve recorrer-se à administração de colostro por via oral. O colostro deve ser administrado nas primeiras 4 a 6 horas de vida, como recurso pode ser utilizado a entubação nasogástrica.

Os leitões estabelecem os tetos no início da lactação, e quando isso não acontece no primeiro dia, a sobrevivência e o crescimento são afetados negativamente (Skok & Skorjanc, 2014). Leitegadas 100% biológicos apresentaram menor disputa entre tetos no primeiro dia de vida comparado com leitões de mães diferentes. E leitões que foram transferidos depois das 24 horas de vida, a competição pelo teto é resolvida rapidamente (Heim et al., 2012).

O substituto do leite estão disponíveis no mercado com o objetivo de atender a demanda nutricional de leitões órfãos ou quando a fêmea apresenta número de nascidos superior ao número de tetos e que conseqüentemente o colostro ou leite será insuficiente para atender todos os leitões (Azain et al., 1996) A suplementação com sucedâneo em leitões lactentes é capaz de gerar animais mais pesados ao desmame e aumentar o número de desmamados (Azain et al., 1996; Wolter et al., 2002). Porém, em outro estudo realizado com leitões de 23 dias de idade verificou que a colonização de *E. coli* foi maior no grupo alimentado com sucedâneo; bem como a concentração de IgG na mucosa intestinal foi menor nos leitões alimentados com sucedâneo quando comparados aos leitões que ingeriram leite de porca (Sugiharto et al., 2015).

A importância do colostro na espécie suína esta bem documentado, no entanto há poucos estudos que demonstram a transferência de células imunes e citocinas do colostro da fêmea para o recém nascido, portanto nosso estudo traz novas perspectivas sobre a importância da ingestão de colostro pelo suíno recém nascido focado em desenvolvimento do sistema imune e na aquisição de componentes imunológicos da mãe para a prole via colostro, bem como reforça a quantidade mínima que deve ser ingerida nas primeiras 24 horas de vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, M. (2009). The mucosal immune system: Recent developments and future directions in the pig. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(3), 375-383.
- BALACHANDRAN, Y., KNAUS, S., CALDWELL, S. & SINGH, B. (2015). Toll-like receptor 10 expression in chicken, cattle, pig, dog, and rat lungs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(3-4), 184-192.
- BANDRICK, M., ARIZA-NIETO, C., BAIDOO, S. K. & MOLITOR, T. W. (2014). Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(1), 114-120.
- BAURIEDEL, W. R., HOERLEIN, A. B., PICKEN, J. C. & UNDERKOFER, L. A. (1954). Pig Nutrition - Selection of Diet for Studies of Vitamin-B12 Depletion Using Unsuckled Baby Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(9), 468-472.
- BAXTER, E. M., JARVIS, S., PALAREA-ALBALADEJO, J. & EDWARDS, S. A. (2012). The Weaker Sex? The Propensity for Male-Biased Piglet Mortality. *Plos One*, 7(1).
- BIANCHI, A. T. J., ZWART, R. J., JEURISSEN, S. H. M. & MOONENLEUSEN, H. W. M. (1992). Development of the B-Cell and T-Cell Compartments in Porcine Lymphoid Organs from Birth to Adult Life - an Immunohistological Approach. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 33(3), 201-221.
- BITTENCOURT, C. G. (org.). **Relatório anual do desempenho da produção de suínos**. 13. ed. Agriness, 2020. 56 p. Disponível em: https://comunicacao-agriness.s3-sa-east-1.amazonaws.com/relatorio_melhores_web_edicao13.pdf. Acesso em: 12 fev. 2022
- BJORKMAN, S., OLIVIERO, C., RAJALA-SCHULTZ, P. J., SOEDE, N. M. & PELTONIEMI, O. A. T. (2017). The effect of litter size, parity and farrowing duration on placenta expulsion and retention in sows. *Theriogenology*, 92, 36-44.
- BUTLER, J. E., SINKORA, M., WERTZ, N., HOLTMEIER, W. & LEMKE, C. D. (2006). Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Veterinary Research*, 37(3), 417-441.
- BUTLER, J. E., ZHAO, Y., SINKORA, M., WERTZ, N. & KACSKOVICS, I. (2009). Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(3), 321-333.
- CABRERA, R. A., LIN, X., CAMPBELL, J. M., MOESER, A. J. & ODLE, J. (2012). Influence of birth order, birth weight, colostrum and serum immunoglobulin G on neonatal piglet survival. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3.
- CARNEY-HINKLE, E. E., TRAN, H., BUNDY, J. W., MORENO, R., MILLER, P. S. & BURKEY, T. E. (2013). Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2885-2893.
- CERF-BENSUSSAN, N. & GABORIAU-ROUTHIAU, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology*, 10(10), 735-744.
- CLARKE, R. M. & HARDY, R. N. (1971). Histological Changes in Small Intestine of Young Pig and Their Relation to Macromolecular Uptake. *Journal of Anatomy*, 108(Jan), 63-&.
- DANIELSEN, M., PEDERSEN, L. J. & BENDIXEN, E. (2011). An in vivo characterization of colostrum protein uptake in porcine gut during early lactation. *Journal of Proteomics*, 74(1), 101-109.
- DECALUWE, R., MAES, D., DECLERCK, I., COOLS, A., WUYTS, B., DE SMET, S. & JANSSENS, G. P. J. (2013). Changes in back fat thickness during late gestation predict colostrum yield in sows. *Animal*, 7(12), 1999-2007.
- DECLERCK, I., DEWULF, J., PIEPERS, S., DECALUWE, R. & MAES, D. (2015). Sow and litter factors influencing colostrum yield and nutritional composition. *Journal of Animal Science*, 93(3), 1309-1317.
- DEVILLERS, N., FARMER, C., LE DIVIDICH, J. & PRUNIER, A. (2007). Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs. *Animal*, 1(7), 1033-1041.

- DEVILLERS, N., FARMER, C., MOUNIER, A. M., LE DIVIDICH, J. & PRUNIER, A. (2004). Hormones, IgG and lactose changes around parturition in plasma, and colostrum or saliva of multiparous sows. *Reproduction Nutrition Development*, 44(4), 381-396.
- DEVILLERS, N., LE DIVIDICH, J. & PRUNIER, A. (2011). Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal*, 5(10), 1605-1612.
- DONOVAN, S. M., MCNEIL, L. K., JIMENEZFLORES, R. & ODLE, J. (1994). Insulin-Like Growth-Factors and Insulin-Like Growth-Factor Binding-Proteins in Porcine Serum and Milk Throughout Lactation. *Pediatric Research*, 36(2), 159-168.
- DOUGLAS, S. L., EDWARDS, S. A., SUTCLIFFE, E., KNAP, P. W. & KYRIAZAKIS, I. (2013). Identification of risk factors associated with poor lifetime growth performance in pigs. *Journal of Animal Science*, 91(9), 4123-4132.
- EDWARDS, S. A. (2002). Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions? *Livestock Production Science*, 78(1), 3-12.
- EVANS, P. A., NEWBY, T. J., STOKES, C. R. & BOURNE, F. J. (1982). A Study of Cells in the Mammary Secretions of Sows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3(5), 515-527.
- FARMER, C. & QUESNEL, H. (2009). Nutritional, hormonal, and environmental effects on colostrum in sows. *Journal of Animal Science*, 87(13 Suppl), 56-64.
- FARMER, C., ROBERT, S. & RUSHEN, J. (1998). Bromocriptine given orally to periparturient of lactating sows inhibits milk production. *Journal of Animal Science*, 76(3), 750-757.
- FERRARI, C. V., SBARDELLA, P. E., BERNARDI, M. L., COUTINHO, M. L., VAZ, I. S., JR., WENTZ, I. & BORTOLOZZO, F. P. (2014). Effect of birth weight and colostrum intake on mortality and performance of piglets after cross-fostering in sows of different parities. *Prev Vet Med*, 114(3-4), 259-266.
- FIX, J. S., CASSADY, J. P., HOLL, J. W., HERRING, W. O., CULBERTSON, M. S. & SEE, M. T. (2010). Effect of piglet birth weight on survival and quality of commercial market swine. *Livestock Science*, 132(1-3), 98-106.
- FOISNET, A., FARMER, C., DAVID, C. & QUESNEL, H. (2010). Relationships between colostrum production by primiparous sows and sow physiology around parturition. *Journal of Animal Science*, 88(5), 1672-1683.
- FORNER, R., BOMBASSARO, G., BELLAVER, F. V., MACIAG, S., FONSECA, F. N., GAVA, D., LOPES, L., MARQUES, M. G. & BASTOS, A. P. (2021). Distribution difference of colostrum-derived B and T cells subsets in gilts and sows. *Plos One*, 16(5).
- FURTADO, C. D. D., MELLAGI, A. P. G., CYPRIANO, C. R., GAGGINI, T. S., BERNARDI, M. L., WENTZ, I. & BORTOLOZZO, F. P. (2012). Influence of Birth Weight and of Oral, Umbilical or Limb Lesions on Performance of Suckling Piglets. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(4).
- GIGUERE, S. & POLKES, A. C. (2005). Immunologic disorders in neonatal foals. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 21(2), 241-+.
- HECK, A. (2007). Como prevenir e manejar problemas de leitões refugos na maternidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 10.
- HEIM, G., MELLAGI, A. P. G., BIERHALS, T., DE SOUZA, L. P., DE FRIES, H. C. C., PIUCO, P., SEIDEL, E., BERNARDI, M. L., WENTZ, I. & BORTOLOZZO, F. P. (2012). Effects of cross-fostering within 24 h after birth on pre-weaning behaviour, growth performance and survival rate of biological and adopted piglets. *Livestock Science*, 150(1-3), 121-127.
- HLAVOVA, K., STEPANOVA, H. & FALDYNA, M. (2014). The phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum suggest these are central/effector memory cells. *Veterinary Journal*, 202(3), 477-482.
- HOEBE, K., JANSSEN, E. & BEUTLER, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10), 971-974.
- HURLEY, W. L. & THEIL, P. K. (2011). Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*, 3(4), 442-474.

- JAEGER, L. A., LAMAR, C. H., BOTTOMS, G. D. & CLINE, T. R. (1987). Growth-Stimulating Substances in Porcine Milk. *American Journal of Veterinary Research*, 48(10), 1531-1533.
- JENSEN, A. R., ELNIF, J., BURRIN, D. G. & SANGILD, P. T. (2001). Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. *Journal of Nutrition*, 131(12), 3259-3265.
- KEMP, B., DA SILVA, C. L. A. & SOEDE, N. M. (2018). Recent advances in pig reproduction: Focus on impact of genetic selection for female fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 28-36.
- KENSINGER, R. S., COLLIER, R. J., BAZER, F. W., DUCSAY, C. A. & BECKER, H. N. (1982). Nucleic-Acid, Metabolic and Histological-Changes in Gilt Mammary Tissue during Pregnancy and Lactogenesis. *Journal of Animal Science*, 54(6), 1297-1308.
- KILBRIDE, A. L., MENDEL, M., STATHAM, P., HELD, S., HARRIS, M., COOPER, S. & GREEN, L. E. (2012). A cohort study of preweaning piglet mortality and farrowing accommodation on 112 commercial pig farms in England. *Prev Vet Med*, 104(3-4), 281-291.
- KIM, Y. B. (1975). Developmental immunity in the piglet. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 11(1), 549-557.
- KLOBASA, F. & BUTLER, J. E. (1987). Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M, and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers. *American Journal of Veterinary Research*, 48(2), 176-182.
- KLOBASA, F., WERHAHN, E. & BUTLER, J. E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Research in Veterinary Science*, 31(2), 195-206.
- LAI, I. H., TSAO, J. H., LU, Y. P., LEE, J. W., ZHAO, X., CHIEN, F. L. & MAO, S. J. T. (2009). Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Veterinary Research*, 40(3).
- LAVAL, F., PAILLOT, R., BOLLARD, S., FISCHER, L., AUDONNET, J. C., ANDREONI, C. & JUILLARD, V. (2002). Quantitative analysis of the antigen-specific IFN gamma(+) T cell-mediated immune response in conventional outbred pigs: kinetics and duration of the DNA-induced IFN gamma(+) CD8(+) T cell response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90(3-4), 191-201.
- LAY, D. C., KATTESH, H. G., CUNNICK, J. E., DANIELS, M. J., MCMUNN, K. A., TOSCANO, M. J. & ROBERTS, M. P. (2008). Prenatal stress effects on pig development and response to weaning. *Journal of Animal Science*, 86(6), 1316-1324.
- LE DIVIDICH, J., ROOKE, J. A. & HERPIN, P. (2005). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *Journal of Agricultural Science*, 143, 469-485.
- LEBOUDER, E., REY-NORES, J. E., RUSHMERE, N. K., GRIGOROV, M., LAWN, S. D., AFFOLTER, M., GRIFFIN, G. E., FERRARA, P., SCHIFFRIN, E. J., MORGAN, B. P. & LABETA, M. O. (2003). Soluble forms of toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *Journal of Immunology*, 171(12), 6680-6689.
- LECCE, J. G. (1966). Glucose milliequivalents eaten by the neonatal pig and cessation of intestinal absorption of large molecules (closure). *Journal of Nutrition*, 90(3), 240-244.
- LI, Y. Z., ANDERSON, J. E. & JOHNSTON, L. J. (2012). Animal-related factors associated with piglet mortality in a bedded, group-farrowing system. *Canadian Journal of Animal Science*, 92(1), 11-20.
- LICENCE, S. T. & BINNS, R. M. (1995). Major Long-Term Changes in Gamma-Delta T-Cell Receptor-Positive and Cd2(+) T-Cell Subsets after Neonatal Thymectomy in the Pig - a Longitudinal-Study Lasting Nearly 2 Years. *Immunology*, 85(2), 276-284.
- LOISEL, F., FARMER, C., VAN HEES, H. & QUESNEL, H. (2015). Relative prolactin-to-progesterone concentrations around farrowing influence colostrum yield in primiparous sows. *Domestic Animal Endocrinology*, 53, 35-41.

- MAGNUSSON, U., RODRIGUEZMARTINEZ, H. & EINARSSON, S. (1991). A Simple, Rapid Method for Differential Cell Counts in Porcine Mammary Secretions. *Veterinary Record*, 129(22), 485-490.
- MARKOWSKA-DANIEL, I. & POMORSKA-MOL, M. (2010). Shifts in Immunoglobulins Levels in the Porcine Mammary Secretions during Whole Lactation Period. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54(3), 345-349.
- MCCAULEY, I. & HARTMANN, P. E. (1984). Changes in piglet leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Research in Veterinary Science*, 37(2), 234-241.
- MILLIGAN, B. N., FRASER, D. & KRAMER, D. L. (2001). The effect of littermate weight on survival, weight gain, and suckling behavior of low-birth-weight piglets in cross-fostered litters. *Journal of Swine Health and Production*, 9(4), 161-166.
- MILON, A., AUMAITRE, A., LEDIVIDICH, J., FRANZ, J. & METZGER, J. J. (1983). Influence of Birth Prematurity on Colostrum Composition and Subsequent Immunity of Piglets. *Annales De Recherches Veterinaires*, 14(4), 533-540.
- NGUYEN, T. V., YUAN, L. J., AZEVEDO, M. S. P., JEONG, K. I., GONZALEZ, A. M. & SAIF, L. J. (2007). Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: In vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(3-4), 236-248.
- ODLE, J., ZIJLSTRA, R. T. & DONOVAN, S. M. (1996). Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *Journal of Animal Science*, 74(10), 2509-2522.
- PALOMBO, V., LOOR, J. J., D'ANDREA, M., VAILATI-RIBONI, M., SHAHZAD, K., KROGH, U. & THEIL, P. K. (2018). Transcriptional profiling of swine mammary gland during the transition from colostrogenesis to lactogenesis using RNA sequencing. *Bmc Genomics*, 19.
- PIRIOU, L., CHEVALLIER, S., HUTET, E., CHARLEY, B., LE POTIER, M. F. & ALBINA, E. (2003). Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Veterinary Research*, 34(4), 389-404.
- PODOLSKY, D. K. (1999). Mucosal Immunity and Inflammation V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(3), G495-G499.
- POMORSKA-MOL, M., MARKOWSKA-DANIEL, I. & BEDNAREK, D. (2010). Flow Cytometric Analysis of Leukocytes in Porcine Mammary Secretions. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54(2), 188-192.
- POULSEN, A. S. R., DE JONGE, N., SUGIHARTO, S., NIELSEN, J. L., LAURIDSEN, C. & CANIBE, N. (2017). The microbial community of the gut differs between piglets fed sow milk, milk replacer or bovine colostrum. *British Journal of Nutrition*, 117(7), 964-978.
- QUESNEL, H. (2011). Colostrum production by sows: variability of colostrum yield and immunoglobulin G concentrations. *Animal*, 5(10), 1546-1553.
- QUESNEL, H., FARMER, C. & DEVILLERS, N. (2012). Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livestock Science*, 146(2-3), 105-114.
- QUESNEL, H., GONDRET, F., MERLOT, E. & FARMER, C. (2015). Sow influence on piglet colostrum intake and neonatal survival. *Inra Productions Animales*, 28(4), 295-304.
- QUINIOU, N., DAGORN, J. & GAUDRE, D. (2002). Variation of piglets birth weight and consequences on subsequent performance. *Livestock Production Science*, 78(1), 63-70.
- RAIDAL, S. L., MCTAGGART, C. & PENHALE, J. (2005). Effect of withholding macromolecules on the duration of intestinal permeability to colostral IgG in foals. *Australian Veterinary Journal*, 83(1-2), 78-81.
- REN, J., YAN, X. M., AI, H. S., ZHANG, Z. Y., HUANG, X., OUYANG, J., YANG, M., YANG, H. G., HAN, P. F., ZENG, W. H., CHEN, Y. J., GUO, Y. M., XIAO, S. J., DING, N. S. & HUANG, L. S. (2012). Susceptibility towards Enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac Diarrhea Is Governed by the MUC13 Gene in Pigs. *Plos One*, 7(9).
- ROOKE, J. A. & BLAND, I. M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*, 78(1), 13-23.

- RUMBO, M., CHIRDO, F. G., ANON, M. C. & FOSSATI, C. A. (1998). Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clinical and Experimental Immunology*, 112(3), 453-458.
- SALMON, H., BERRI, M., GERDTS, V. & MEURENS, F. (2009). Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(3), 384-393.
- SANGILD, P. T., TRAHAIR, J. F., LOFTAGER, M. K. & FOWDEN, A. L. (1999). Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrum in utero. *Pediatric Research*, 45(4), 595-602.
- SCHNULLE, P. M. & HURLEY, W. L. (2003). Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(3-4), 227-231.
- SIGGERS, R. H., THYMAN, T., SIGGERS, J. L., SCHMIDT, M., HANSEN, A. K. & SANGILD, P. T. (2007). Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate. *Livestock Science*, 109(1-3), 14-18.
- SINKORA, J., REHAKOVA, Z., SINKORA, M., CUKROWSKA, B., TLASKALOVA-HOGENOVA, H., BIANCHI, A. T. & DE GEUS, B. (1998). Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology*, 95(3), 443-449.
- SINKORA, M. & BUTLER, J. E. (2016). Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 1-17.
- SINKORA, M., SINKORA, J., REHAKOVA, Z. & BUTLER, J. E. (2000). Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *Journal of Immunology*, 165(4), 1832-1839.
- SINKORA, M., SINKOROVA, J., CIMBUREK, Z. & HOLTMEIER, W. (2007). Two groups of porcine TCRgammadelta+ thymocytes behave and diverge differently. *Journal of Immunology*, 178(2), 711-719.
- SINKORA, M., SUN, J., SINKOROVA, J., CHRISTENSON, R. K., FORD, S. P. & BUTLER, J. E. (2003). Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VI. B cell lymphogenesis occurs at multiple sites with differences in the frequency of in-frame rearrangements. *Journal of Immunology*, 170(4), 1781-1788.
- SIPOS, W., DUVIGNEAU, C., PIETSCHMANN, P., HOLLER, K., HARTL, R., WAHL, K., STEINBORN, R., GEMEINER, M., WILLHEIM, M. & SCHMOLL, F. (2003). Parameters of humoral and cellular immunity following vaccination of pigs with a European modified-live strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Viral Immunol*, 16(3), 335-346.
- SKOK, J. & SKORJANC, D. (2014). Group suckling cohesion as a prelude to the formation of teat order in piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, 154, 15-21.
- SKRZYPEK, T., VALVERDE PIEDRA, J. L., SKRZYPEK, H., WOLINSKI, J., KAZIMIERCZAK, W., SZYMANCZYK, S., PAWLOWSKA, M. & ZABIELSKI, R. (2005). Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. *J Physiol Pharmacol*, 56 Suppl 3, 71-87.
- SMITH, M. W. & JARVIS, L. G. (1978). Growth and cell replacement in the new-born pig intestine. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 203(1150), 69-89.
- SMITH, M. W. & PEACOCK, M. A. (1980). Anomalous replacement of foetal enterocytes in the neonatal pig. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 206(1165), 411-420.
- SUGIHARTO, S., POULSEN, A. S., CANIBE, N. & LAURIDSEN, C. (2015). Effect of bovine colostrum feeding in comparison with milk replacer and natural feeding on the immune responses and colonisation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the intestinal tissue of piglets. *Br J Nutr*, 113(6), 923-934.
- THEIL, P. K., LAURIDSEN, C. & QUESNEL, H. (2014). Neonatal piglet survival: impact of sow nutrition around parturition on fetal glycogen deposition and production and composition of colostrum and transient milk. *Animal*, 8(7), 1021-1030.

- THIELKE, K. H., HOFFMANN-MOUJAHID, A., WEISSER, C., WALDKIRCH, E., PABST, R., HOLTMEIER, W. & ROTHKOTTER, H. J. (2003). Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood. *European Journal of Immunology*, 33(6), 1649-1656.
- TUCHSCHERER, M., PUPPE, B., TUCHSCHERER, A. & TIEMANN, U. (2000). Early identification of neonates at risk: Traits of newborn piglets with respect to survival. *Theriogenology*, 54(3), 371-388.
- VADMAND, C. N., KROGH, U., HANSEN, C. F. & THEIL, P. K. (2015). Impact of sow and litter characteristics on colostrum yield, time for onset of lactation, and milk yield of sows. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2488-2500.
- VAERMAN, J. P., LANGENDRIES, A., PABST, R. & ROTHKOTTER, H. J. (1997). Contribution of serum IgA to intestinal lymph IgA, and vice versa, in minipigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(3-4), 301-308.
- WAGSTROM, E. A., YOON, K. J. & ZIMMERMAN, J. J. (2000). Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol*, 13(3), 383-397.
- WERHAHN, E., KLOBASA, F. & BUTLER, J. E. (1981). Investigation of Some Factors Which Influence the Absorption of Igg by the Neonatal Piglet. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2(1), 35-51.
- WILLIAMS, P. P. (1993). Immunomodulating Effects of Intestinal Absorbed Maternal Colostral Leukocytes by Neonatal Pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 57(1), 1-8.
- XU, R. J., TUNGTHANATHANICH, P., BIRTLES, M. J., MELLOR, D. J., REYNOLDS, G. W. & SIMPSON, H. V. (1992). Growth and morphological changes in the stomach of newborn pigs during the first three days after birth. *Journal of Developmental Physiology*, 17(1), 7-14.
- ZUCKERMANN, F. A. & HUSMANN, R. J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology*, 87(3), 500-512.

CAPITULO I

Artigo submetido a Revista Nature Immunology

The influence of source of porcine colostrum in development of early immune ontogeny in the piglet

Shaiana S. Maciag¹, Franciana V. Bellaver², Gabrielly Bombassaro², Vanessa Haach³, Marcos A. Z. Morés⁴, Lana F. Baron², Arlei Coldebella⁴, Ana P. Bastos^{4*}

¹Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná – Campus CEDETEG, Guarapuava-PR, Brazil

²Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Concórdia-SC, Brazil

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

⁴Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brazil

*Corresponding author

E-mail: ana.bastos@embrapa.br (AB)

Abstract

The effect of colostrum feeding on the ontogeny of serum cytokines and immune cells in suckling piglets fed sow/gilt colostrum and milk replacer was studied. The study was conducted on 4 gilts and 5 sows (fourth and sixth-parity). After farrowing, piglets were randomized into six groups: GG and SS: piglets were kept with their dam; GS: piglets were changed from gilts to sow and allowed to suckle as normal; SG: piglets were changed from sow to gilt and allowed to suckle as normal; GMR and SMR: piglets from gilt or sow were isolated from the dams and were bottle-fed commercial formula milk replacer for pigs every 1 hour during the first 24 hours of life. The piglets remained in the groups during the first 24 hours of life and were later returned to their respective mothers. Piglets were euthanized at 24 hours and 28 days of age. Overall, there was a higher concentration of serum immunoglobulins at 24 hours in groups that suckled sow colostrum and null concentrations in piglets that ingested milk replacer. The ingestion of sow colostrum was associated with a rise in plasma Th1, Th2 or Th17 cytokines concentration and also the greater ability of B and T cells from lymphatic organs and blood mononuclear cells to respond to mitogens. We suggest a possible role of colostrum and sow parity that may contribute to exerting a modulating action on immune response development. Yet, all findings also suggest a bias towards Th1-, Th2-, Th17-cell polarizing and cytokines in the suckling period, which may be immunomodulated by maternal immunological factors in colostrum.

Keywords: colostrum quality, cytokines, parity, lymphocyte subsets, mitogen-stimulated

Introduction

The early development of the immune system of pigs occurs almost entirely during gestation. The immune system has minimal activity until birth, since up to this phase the fetus is protected from antigenic stimuli from pathogenic organisms, with which it has no contact, due to the diffuse epitheliochorial function of the pig's placenta. Therefore, during gestation, the piglet remains in a sterile, impermeable, and protective environment offered by the uterus, which leads to an absence of antibody production in the fetus (Salmon et al., 2009). Moreover, the epitheliochorial nature of the pig's placenta does not allow the transference of maternal immunoglobulin (Igs) to the offspring, such that piglets have agammaglobulinemia at birth and are immunodeficient until weaning (Kim, 1975; Salmon et al., 2009). After birth, the neonate piglet goes from an intrauterine sterile environment to an external environment that is rich in antigens and pathogenic agents; thus demanding an adequate immune response to survive (Le Dividich et al., 2005).

The beginning of immune system activity may be triggered by events during labor, by the colostrum, and by the environment, seeking to promote protection against foreign molecules and microorganisms that are beginning their colonization and challenge the animal (McCauley & Hartmann, 1984). In fact, a piglet's first four weeks of life represent a critical period in which these animals are more susceptible to diseases. Many factors contribute to this situation, among which are the immaturity of the newborn piglet's immune system. These piglets are not able to develop a satisfactory immune response, since their immune system is still functionally immature and lack the necessary time to generate humoral and cellular immunity (Pomorska-Mol et al., 2010; Salmon et al., 2009). Therefore, the components of the immune system are not completely functional in a newborn piglet, requiring a few weeks to reach maturity (Rooke & Bland, 2002).

The immune system originates still during the intrauterine phase and, in pigs, hematopoiesis occurs in three different places; initially the first lymphoid organ is the yolk sac, where stem cells emerge, following to the fetal liver, where they are produced; they then follow to the thymus for the process of cell differentiation, maturation, and selection of T lymphocytes occurs in the thymus cortex and at approximately 40 days of gestation they can be detected in the thymus, receiving the name of double negative thymocytes (Sinkora et al., 2000; Sinkora et al., 2003). The process of negative and positive selection of thymocytes is not clear and can happen in either the second or third trimester of gestation, given that during this period there is an intense death of thymocytes

(Sinkora & Butler, 2016). In general terms, a positive selection allows the survival of T cells that express TCR that can recognize the MHC of the cells themselves, while a negative selection eliminates cells that connect strongly to their own MHC, an important factor to determine self-tolerance (Sinkora et al., 1998; Sinkora & Butler, 2016; Sinkora et al., 2007).

After birth, bone marrow takes on the role of producing lymphocytes and the thymus begins its involution. During the first weeks of life, the immune system progresses rapidly under the shield of passive maternal immunity that originates from the colostrum (Salmon et al., 2009). Primary (bone marrow and thymus) and secondary (such as spleen, Peyer's patches, and lymph nodes) lymphoid organs are the main components of the immune system and their development and maturation carry out an important role in this process.

The immunoglobulin absorption period, which originates from the colostrum, happens during the first hours after the piglet is born and can extend to up to 36 hours after labor. Absorption occurs through the intestine by means of macromolecule endocytosis after ingesting the colostrum (Rumbo et al., 1998). The colostrum contains a series of components that act directly and indirectly in the immunological function of the piglet. Immunoglobulins are the most common of these colostrum components and offer direct protection against antigens. The most abundant types in the colostrum are immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA), and immunoglobulin M (IgM), respectively. After being absorbed by the enterocytes they head to the intestinal lymphatic system, IgA is later sent to mucosa surfaces, while IgG remains in circulation (Butler, 1998). The concentration of IgG in colostrum is several times greater than in the sow's plasma and decreases exponentially over the first 24 hours after labor (Le Dividich et al., 2005).

The colostrum also contains leukocyte cells, such as granulocytes (neutrophils, 40%), T lymphocytes (30%), B lymphocytes (13-16%), and macrophages (7-11%) (Evans et al., 1982, Forner et al., 2021). Pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 are also present in the colostrum; these substances have an immunostimulant effect on the immune response of mitogens (Williams, 1993). In piglets fed with milk replacers and/or substitutes or those that were deprived of sow colostrum, the passive immunity transference from sow to litter does not happen and these piglets do not absorb macromolecules, such that the intestinal cells responsible for this absorption represent open vacuoles, demonstrating that there was no

endocytosis of these macromolecules (Jensen et al., 2001). This study aimed to evaluate the influence of colostrum from gilts, sows and colostrum substitute on the development of the porcine immune system by determining of cytokine piglet's serum, cell numbers, function, and phenotypic expression of immune cells surface of isolated lymphocytes from the blood, spleen, mesenteric lymph node, and thymus and their change with age in the neonatal piglet.

Results

Clinical evaluation. The average weight of piglets at birth was 1.40kg, with no significant differences between the groups ($p > 0,05$) (Supplementary Table 1). The animals that were fed with milk replacer (GMR and SMR) presented diarrhea around 20 hours after birth. Eight piglets (five from GMR and three from SMR) died during the experiment, before completing 28 days. Data from these 24-hour animals were excluded from the experiment. No significant lesions were observed in the necropsy of these pigs, but body weights demonstrated that the piglets were not growing normally, as they had lower weights compared to their siblings.

No significant differences were observed between the groups in body weight gain during the suckling period at 24 hours of age (Supplementary Table 1); but the groups fed milk replacer (GMR and SMR) had lower body weight gain during the weaning period at 28 days of age.

Measurement of immunoglobulin concentrations. Sow parity had a significant ($p < 0.001$) effect on colostral IgG concentration, so the IgG concentrations in colostrum were the highest in sow than in gilts. The IgA and IgM concentrations did not differ between gilts and sows (Figure 1).

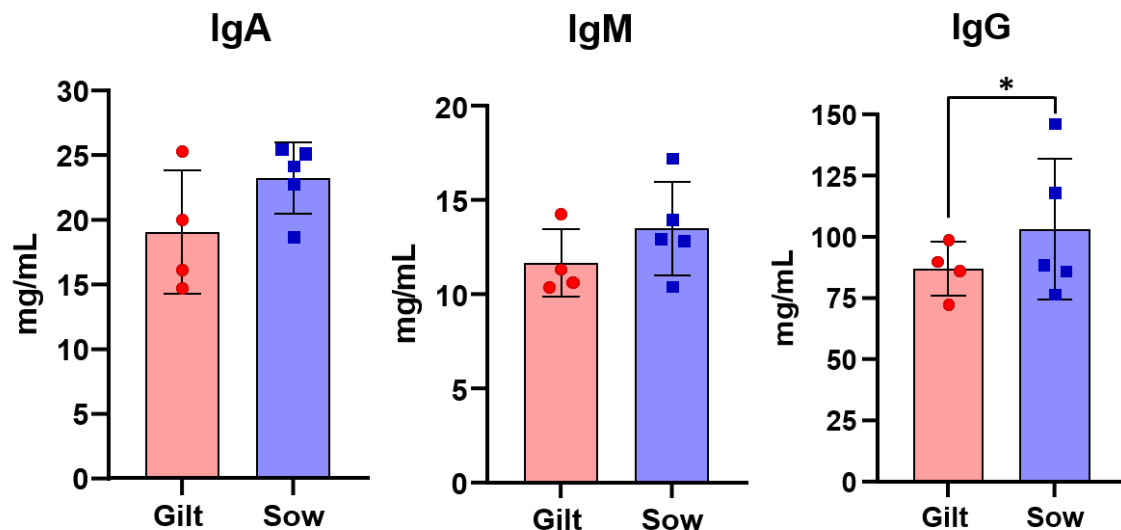


Fig 1. Comparison of total IgG, IgM and IgA concentrations (mg/mL) in colostrum from gilts and sows in the first 3 hours after farrowing. Error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Gilt IgA (19.06 ± 1.37) vs. Sow IgA (23.25 ± 1.22), $p < 0.2207$; Gilt IgM (11.67 ± 0.89) vs. Sow IgM (13.49 ± 1.10), $p < 0.3272$; *Gilt IgG (87.09 ± 5.49) vs. Sow IgG (103.27 ± 12.8), $p < 0.0112$.

Piglet serum Igs concentration at days 1 and 28 of age are indicated in Table 1. The IgG, IgA and IgM concentration, 24 hours from the start of parturition, were consistently lower in piglets fed with milk replacer (GMR, $p < 0.005$; and SMR, $p < 0.0008$) than in the other groups (Figure 2). Serum IgM concentration was higher in piglets suckled gilt colostrum (GG 3.025 ± 0.632 mg/mL and SG 3.025 ± 0.712 mg/mL) than piglets suckled sow colostrum (GS 1.976 ± 0.177 mg/mL and SS 1.876 ± 0.142 mg/mL). Serum IgG level was higher in the SS group, with average 27.81 ± 1.23 mg/mL. Interestingly, piglets suckled sow colostrum, such as SS (27.81 ± 1.23 mg/mL) and GS (25.00 ± 1.55 mg/mL) groups, had higher serum IgG concentrations than piglets suckled gilt colostrum, GG (22.32 ± 2.05 mg/mL) and SG (23.54 ± 1.37 mg/mL) groups.

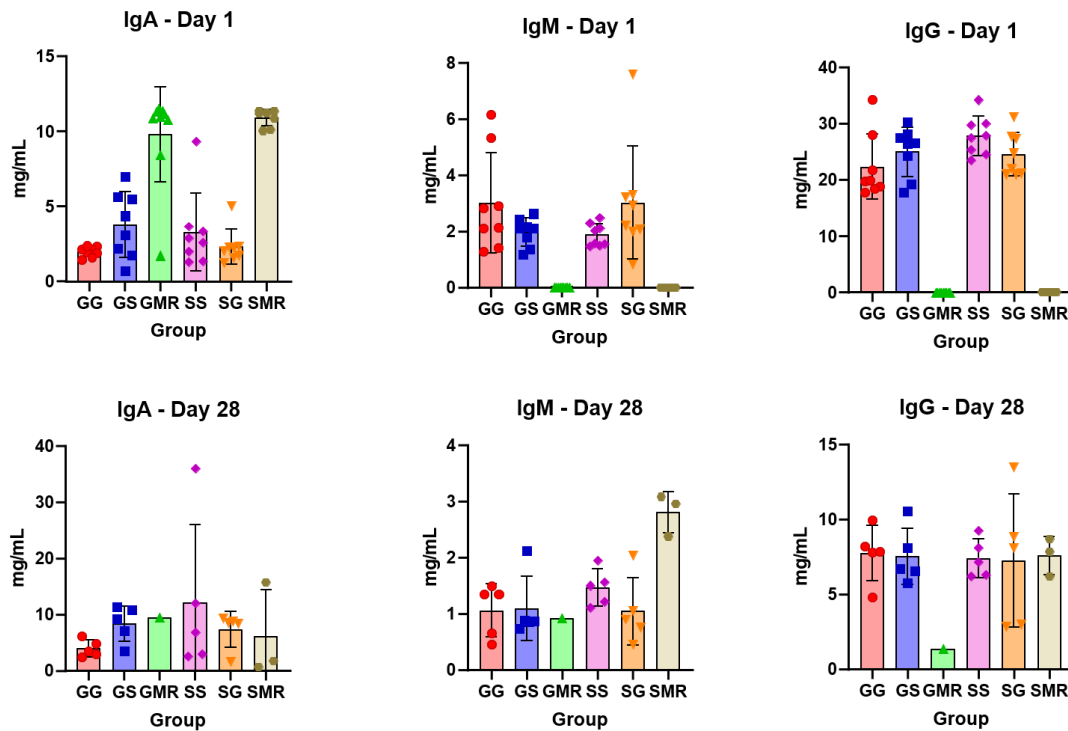


Fig 2. Effect of sow parity and their colostrum on piglet serum immunoglobulins concentration (mg/mL) at 24 hours and 28 days after birth. Error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Different superscript asterisks indicate significant differences among groups ($p \leq 0.05$).

Remaining IgA concentration was also greater in piglets suckled sow colostrum, 3.294 ± 0.714 mg/mL for the SS group and 3.782 ± 0.572 mg/mL for the GS group, when compared to GG (1.983 ± 0.119 mg/mL) and SG (2.326 ± 0.411 mg/mL) groups, whose piglets suckled gilt colostrum. During lactation at 28 days-point, the IgA concentration increased three-fold in the SS group (from 3.294 to 12.06 mg/mL) (Table 1). The amount of IgA in piglets suckled sow colostrum and then gilt milk (GS group) was slightly higher than the group that remained with the gilt (GG), however, it was not significantly higher at 28 days (8.346 mg/mL). The animals that received milk replacer (GMR and SMR) were the only ones that did not show an increase in IgA concentration along with lactation.

As expected, IgG, IgM and IgA concentrations decreased with time in all groups, the levels of these Igs were the higher in the first hour of lactation (Figure 2). Even so, the IgG concentrations in early life were significantly influenced by the colostrum of sow's parity. Piglets that suckled sow colostrum, such as the SS and GS groups, were greater than in GG and SG groups, but this difference did not remain between the groups with mature milk in the weaning period (28 days). Piglets fed with milk replacer (GMR

and SMR) showed an increased IgG level on the 28th day of life. IgM concentrations increased with time in the SMR group (from 0 to 2.802mg/mL, $p=0.05$), and also showed a tendency of higher concentration than the other groups.

Cytokine concentrations in plasma. All cytokines (GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1ra, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α) evaluated by Luminex were expressed, and the levels of pro-and anti-inflammatory cytokines analyzed among piglet groups at 24 hours of age are shown in Table 2.

To identify if maternal immunological factors transferred to offspring via colostrum play a role potential ontogeny changes and immunomodulate the immune repertoire of the offspring, the concentration of plasma cytokines and chemokines in dam and piglet groups over the first day of life were measured.

Comparing the two groups of dams, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α concentrations were significantly higher in sow colostrum ($p<0.05$) and serum ($p<0.05$) than in gilts (Figure 3, Supplementary Table 2 and 3).

Similarly to the analysis of sow cytokines, the GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α concentrations were strongest in the suckling piglet groups with sow's colostrum (SS and GS), then in the suckling piglet groups with gilt's colostrum (GG and SG), and finally the lowest concentrations of these cytokines were observed in the suckling piglet groups that fed milk replacer (Table 2 and Figure 4). Overall, we detected a similar developmental pattern for all Th1, Th2 or Th17 cytokines correlates. Nevertheless, the production of IL-1RA and IL-8 were strongest in suckling piglet groups that fed milk replacer (GMR and SMR) than in piglets suckled sow or gilt colostrum (SS, SG, GG and GS), but was not significantly higher.

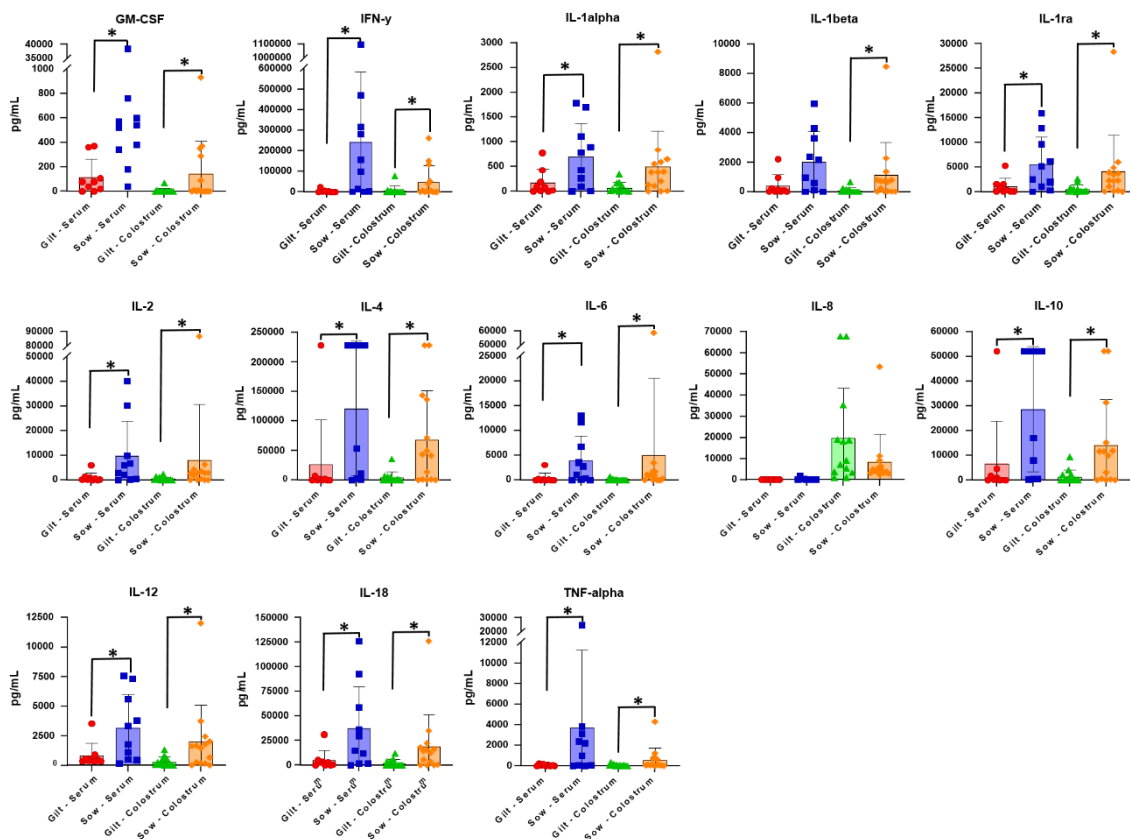


Fig 3. Comparison of cytokines concentrations (pg/mL) in colostrum and serum from gilts and sows in the first 3 hours after farrowing. Error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Different superscript indicate significant differences among groups ($p \leq 0.05$).

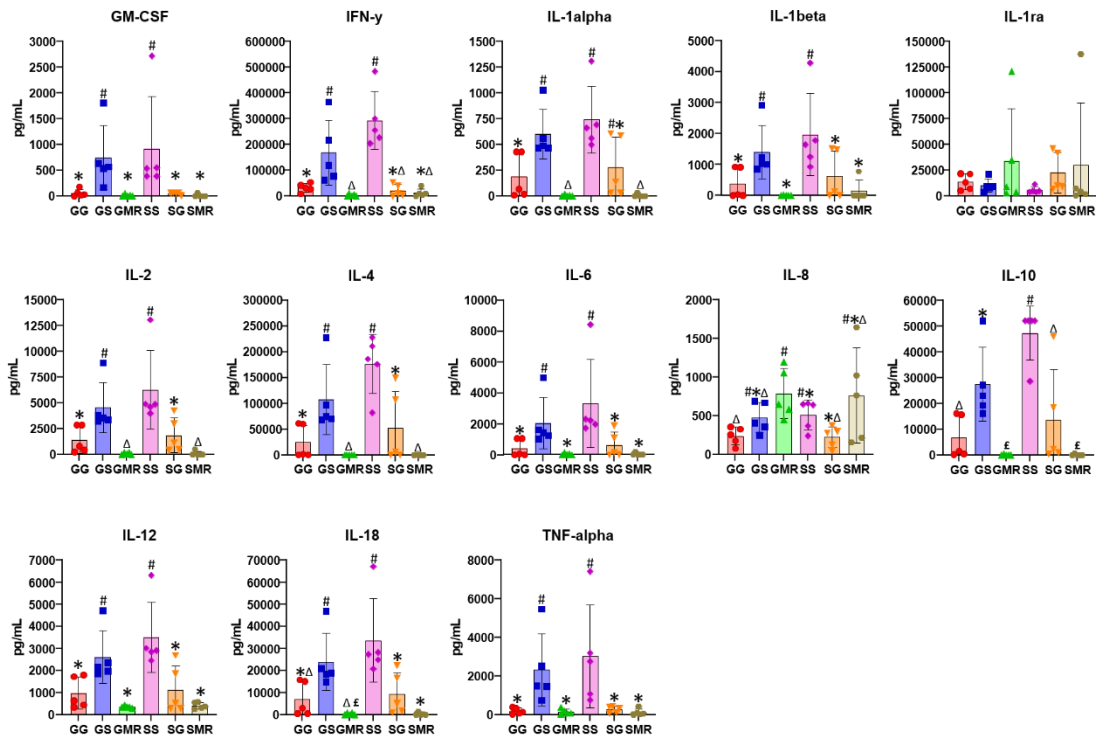


Fig 4. Effect of sow parity and their colostrum on piglet serum cytokines concentration (pg/mL) at 24 hours after birth. Error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Different superscript indicate significant differences among groups ($p \leq 0.05$).

Mitogen-stimulated for lymphocytes from various organs. Trypan blue exclusion staining and microscopic evaluation of viability were performed right after the primary culture cell (thymus, PBMC, spleen and mesenteric lymph node-mLN) at time points according to flow cytometric analysis. The analysis by flow cytometric showed the numbers of macrophages cells, T and B lymphocytes increased with the age of the piglets in all lymphatic tissues evaluated.

The gate was performed as described in our previous work (Forner et al., 2021). In summary, the gate was based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) properties for estimation of the lymphocyte population and debris exclusion, whereas doublet cells were subjected to doublet by plotting the forward scatter height (FSC-H) against the forward scatter area (FSC-A). The dead cells discrimination was excluded using 7-AAD staining. Then, according to CD3, CD4, CD8 α , CD79a, CD19, CD27, CD25 and macrophages expression, seven different cell subsets were defined: (i) CD3e⁺CD4⁺, (ii) CD3e⁺CD4⁺CD27⁺, (iii) CD3e⁺CD4⁺CD25⁺, (iv) CD3e⁺CD8 α ⁺, (v)

CD3e⁺CD8α⁺CD27⁺, (vi) CD19⁺CD79a⁺, and (vii) macrophages⁺. Therefore, CD3⁺ cells were considered to represent 100% of T lymphocytes; CD79a⁺ represent B lymphocytes and macrophages⁺ represent monocyte/macrophage lineage. The foremost predominant immune cell type in lymphatic tissues evaluated was T lymphocytes (Supplementary Table 4).

PBMCs cells were stained with CFSE and then activated with Concanavalin A for 24 hours and 28 days. Results of flow cytometric analysis of these cells are given in Figure 5. Counterstaining with CD3/CD79a and 7-AAD allowed us to gate on live B and T cells and the mean fluorescence intensity of cells. For activated B (CD19⁺CD79a⁺) and T cells (CD3e⁺CD4⁺ and CD3e⁺CD8α⁺), a higher count of these cells were observed in suckling piglet groups with sow's colostrum (SS and GS) to 24 hours (Table 3). A variety of activated cells changes was observed in the weaning period (28 days), the change from colostrum to mature milk also modified the amount of activated B and T cells in piglet groups that suckled colostrum from another dam (GS and SG), from their dam (GG and SS) and fed milk replace (GMR and SMR). In this case, the offspring from sow (SS) that suckled sow's colostrum and mature milk (after 24 hours of life) showed a significantly higher amount of activated T and B cells than their siblings from other groups (SG and SEM), as well as piglets from gilt (GG, GS and GMR), but it was significantly higher in SS group.

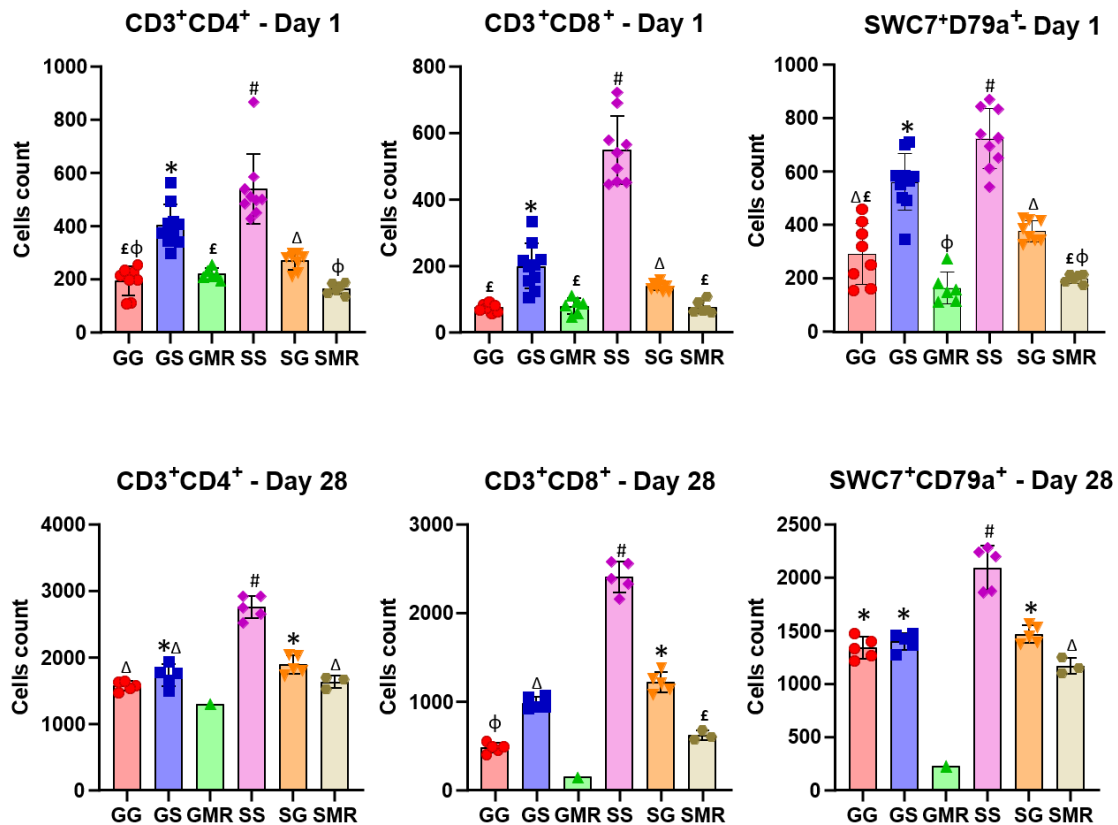


Fig 5. Comparative analysis of CFSE-based lymphocyte proliferation from PBMC in groups. Peripheral blood mononuclear cells were stained with CFSE ($1 \times 10^6/\text{mL}$) and cultured in duplicate. The cells were incubated with medium alone (nonstimulated - control) and with Concanavalin A ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$, stimulated cells). The cells from piglet groups were cultured for 72 hours.

Flow cytometric analysis was performed to determine colostrum's potential on the activation of $\text{CD3e}^+\text{CD4}^+$ helper T cells, $\text{CD3e}^+\text{CD8a}^+$ cytotoxic T cells and T cell subsets in lymphatic organs under Concanavalin A stimulation for 24 hours and 28 days of life. T cell population was more numerous than B cell population. Spontaneous proliferation by non stimulated lymphocytes and proliferation of mitogen-stimulated lymphocytes was significantly affected by age for lymphocytes isolated from peripheral blood, spleen, thymus and mesenteric lymph node (Supplementary Table 4). However, the piglets fed with milk replacer (GMR and SMR groups) showed lower proliferation lymphocytes than groups fed colostrum (SS, SG, GG, and GS).

In addition, the proliferation of isolated lymphocytes was analyzed using the CFSE dye and presented by the stimulation proliferation index. Interestingly, the proliferation of mitogen-stimulated lymphocytes when labeled with CFSE allowed to properly analyze

and compare the difference in lymphocyte proliferation between the groups of piglets (Figure 6) and the lymphoid cell subpopulations were also characterized.

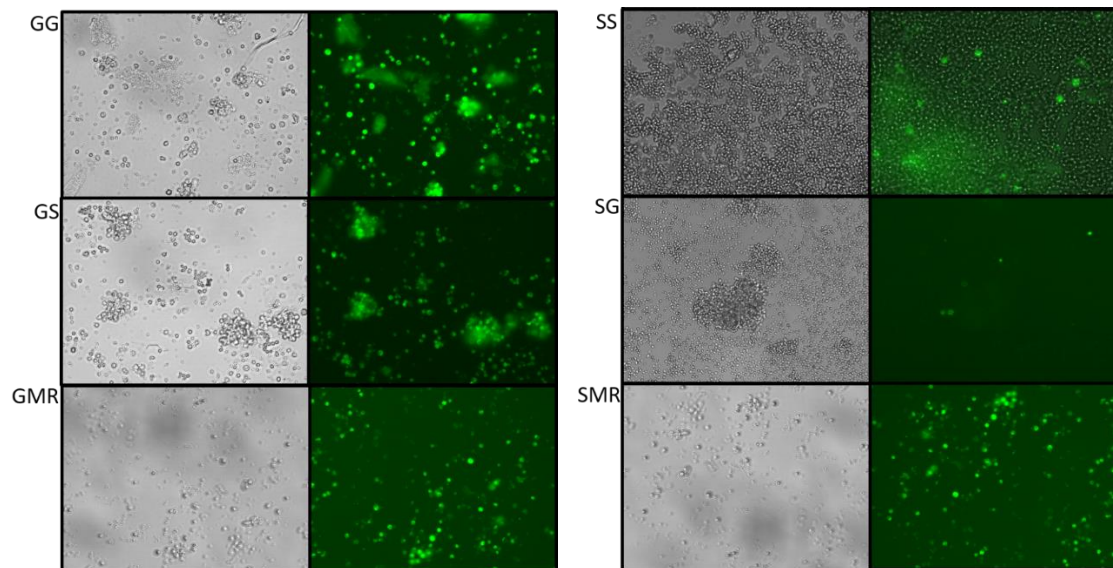


Fig 6. Analysis of CFSE-based lymphocyte proliferation. Thymus cells were stained with CFSE ($1 \times 10^6/\text{mL}$) and cultured in duplicate. The cells were incubated with medium alone (nonstimulated - control) and with Concanavalin A ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$, stimulated cells). The cells from piglet groups were cultured for 96 hours. Cells were imaged on an EVOS M7000 microscope using a 20X; the same laser and gain settings were used to capture images at each point: (A) GG group, (B) GS group, (C) GMR group, (D) SS group, (E) SG group and (F) SMR group, all cells stimulated with Concanavalin A.

The sow colostrum increased the $\text{CD}3\text{e}^+\text{CD}4^+$ helper T-cell population and $\text{CD}4^+$ T cell subsets at 24 hours point, such as $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ regulatory T cell and $\text{CD}3\text{e}^+\text{CD}4^+\text{CD}27^+$ naive and/or central memory $\text{CD}4^+$ T-cell in thymus and spleen; thus these cell populations were significantly influenced by colostrum of sow's parity (Table 4). SS group showed an increased count of $\text{CD}4^+$ population when compared to their siblings of SMR and SG groups ($\text{SS} > \text{SG} > \text{SMR}$ groups) ($p < 0.05$). Piglets of GS group also presented higher content of $\text{CD}4^+$ population ($\text{CD}3\text{e}^+\text{CD}4^+$, $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ and $\text{CD}3\text{e}^+\text{CD}4^+\text{CD}27^+$) in comparison to their siblings of GG and GMR groups.

In relation to $\text{CD}3\text{e}^+\text{CD}8\alpha^+$ cytotoxic T cell population in thymus, spleen and mLN on 24 hours, the piglets were allowed to suckle their mother's colostrum (GG and SS groups) showed a significantly higher amount of cytotoxic T cell than the piglet groups that suckled other mother's colostrum (GS and SG) or were fed with milk replacer (GMR and SMR) ($\text{SG} > \text{SS} > \text{SMR}$ and $\text{GS} > \text{GG} > \text{GMR}$ groups) (Table 4). Similarly,

CD3e⁺CD8a⁺CD27⁺ memory T cells in spleen, thymus and mLN were higher in GG and SS groups than in GS, SG, GMR and SMR groups, but it was significant only in the thymus.

We also evaluated the CD19⁺CD79a⁺ B cell populations of lymphatic tissues. When the piglets were fed with sow colostrum, a higher concentration of B cell was observed in these piglets (SS and GS groups) in splenocytes ($p < 0.05$) and thymocytes ($p < 0.01$). However, B cells from mesenteric lymph node were higher in piglets born from sows (SS, SG and SMR) than gilts (GG, GS and GMR). Furthermore, piglets that received sow colostrum had a greater amount of B cells than their siblings that were fed gilt's colostrum or milk replacer (SS>SG>SMR and GS>GG>GMR groups) (Table 4).

Data for age-related changes in transcription factor expression of T and B cells are shown in Table 5. As expected, a considerable increase of cell population with age was observed. Similar to 24 hours observations in different organs, Concanavalin A stimulation tended to show an increased helper T cell (CD3e⁺CD4⁺), naive and/or central memory T cell (CD3e⁺CD4⁺CD27⁺) and B cell (CD19⁺CD79a⁺) population in piglets that suckled sow's colostrum compared to sibling piglets that were suckled gilt's colostrum and fed milk replacer (SS>SG>SMR and GS>GG>GMR groups). However, about CD3e⁺CD4⁺CD25⁺ and CD3e⁺CD8a⁺CD27⁺ T cells were observed a higher population in piglets kept with their own dam and allowed to suckle as normal (SS>SG>SMR and GG>GS>GMR groups) ($p < 0.05$). For CD3e⁺CD8a⁺ T cells isolated from thymus and spleen were showed an increase in piglet groups that suckled other dam's colostrum (SG>SS>SMR and GS>GG>GMR groups). The number of monocytes/macrophages in the spleen, thymus and mesenteric lymph node tended to be higher in the piglets from the sow's groups (SS, SG and SEM) than in the gilt group, but the difference was not significant.

Discussion

The immunoglobulins present in the colostrum are an important component for the initial immunological defense of the newborn, given that in pigs this is the only source of maternal antibodies for the litter. The concentration of IgG in the colostrum of females in the study was a mean 83.51 mg/mL, demonstrating that this was a good quality colostrum, considering a good quality level between 50 and 80 mg/mL of IgG during the first hours after labor (Balzani et al., 2016). IgG is the most common type of

immunoglobulin present in the colostrum and almost 100% derives from the sow's serum (Markowska-Daniel & Pomorska-Mol, 2010), which transfers from the blood to the mammary gland by means of the FcRn receptor during colostrum genesis (Cervenak & Kacs Kovics, 2009; Schnulle & Hurley, 2003).

The secretion of IgA and IgM in the colostrum is mediated by the polymeric Ig receptor (pIgR) in the mammary gland (Kumura et al., 2000). IgA is the second most present in the colostrum and is the predominant type of immunoglobulin in the milk, with 40% originating in the blood and the majority produced in the mammary gland during lactation, considering that almost 90% is produced locally (Markowska-Daniel & Pomorska-Mol, 2010). Although the concentration of IgM in the colostrum observed in the present study did not present differences between gilts and sows, the IgG content was higher in sows, which is consistent with previous results (Klobasa et al., 1986; Markowska-Daniel & Pomorska-Mol, 2010; Quesnel, 2011; Quesnel et al., 2012). However, this was not reflected in the IgA concentration in the total colostrum of the current study, with no differences between primiparous and multiparous sows, contrasting with several recent studies (Quesnel, 2011; Quesnel et al., 2012), but with similar results to previous studies of our group (Forner et al., 2021). These differences may be due to responses to nutritional changes (Devillers et al., 2007), as well as the genetic advances and moment when the colostrum sample are collected (Bland et al., 2003).

The IgG concentration colostrum is known to be highly variable among sows; therefore, genotype, parity, age, vaccination stage and endocrine status of the sow, nutrition, and herd management influences the yield and composition of the colostrum (Devillers et al., 2007; Foisnet et al., 2010; Vallet et al., 2013). The concentration of IgG in maternal colostrum significantly affects acquired immunity and, therefore, knowledge about IgG content in the colostrum using precise measurements is crucial for adequate management when seeking to decrease pre-weaning mortality among piglets. The concentration of IgG in pig colostrum can vary between 48.0 and 95.6 mg/mL (Quesnel, 2011; Tuchscherer et al., 2000). Due to the influence of parity in the concentration of colostrum immunoglobulins (Farmer & Quesnel, 2009), it is expected that piglets that are fed colostrum from sows receive a higher concentration of immunoglobulins than those that are nursed by gilts. Thus, we observed in this study a difference in the serum concentration of G and M immunoglobulins among sibling piglets. This variability was a consequence of the type of colostrum that these siblings received; we observed a higher concentration in the SS group than in the SG group, and also that the GS group had a

higher immunoglobulin concentration than the GG group. In the present study, piglets that received colostrum from multiparous sows presented higher serum concentrations of IgG, IgA, and IgM than the piglets that received colostrum from gilts. Moreover, the sibling piglets that received replacers presented a “negative” concentration of IgG and IgM during their first 24 hours of life and showed a concentration that was 10 times lower than among their siblings that received colostrum (GG, GS, SS and SG) with 28 days of life. The intestinal mucosa is very sensitive to dietary stimuli, so piglets fed only with milk replacers since birth have an early cessation of macromolecule endocytosis (Jensen et al., 2001). This clarifies the reason why piglets in these groups (GMR and SMR) of the present study did not present any IgG titer in their serum, even once being returned to their mothers after 24 hours of life, thus suggesting that intestinal absorption and closure had already happened.

Piglets deprived of colostrum ingestion in the first 24 hours of life and/or fed only with milk replacer since birth did not present immunoglobulin titers in their serum after completing these first 24 hours of life (groups GMR and SMR), demonstrating that the piglets have agammaglobulinemia at birth and that the only way to acquire immunoglobulin is through the colostrum, thus corroborating several other studies (Jensen et al., 2001; Kim, 1975; Le Dividich et al., 2005; Sangild et al., 1999).

During the study, eight animals died. They all died during the period between 5 and 20 days of life, considering that animals were assessed for a period of 28 days. These eight animals belonged to the group that received the milk replacer (five animals from GMR and three from SMR). Due to the high mortality observed in these animals during the pre-weaning period, we chose to not use more animals since the diet they received during the first 24 hours of life left them immunocompromised, according to the immunological assessments carried out among the few surviving animals of the group. In fact, IgG is the clinically most important type of immunoglobulin during these first weeks of life, and the concentration of IgG in piglet plasma after birth is positively correlated with survival. Moreover, the dead piglets had a lower IgG serum concentration than the surviving piglets, indicating that colostrum had not been absorbed, even once they were returned to their mothers and nursed with maternal milk after 24 hours (Ferrari et al., 2014; Vallet et al., 2013). It is important to mention that piglets become immunocompetent after 4 weeks of age (Langel et al., 2016; Salmon et al., 2009). Therefore, reduced growth among the litter and mortality of healthy offspring can be considered a consequence of immunologically poor colostrum production (Carney-

Hinkle et al., 2013), given that IgG content in colostrum varies greatly among sows (Foisnet et al., 2010; Markowska-Daniel & Pomorska-Mol, 2010).

The serum concentration of immunoglobulins in piglets also varies greatly between herds and between sows (Kielland et al., 2015). The present results corroborate that there is a strong association between the IgG concentration found in colostrum and the serum concentration of IgG in the piglet. This demonstrates that an increase in the IgG level of colostrum improves IgG levels in piglets and could potentially increase their survival rates (Kielland et al., 2015). Paying extra attention to small piglets in a non-homogeneous litter may be necessary to guarantee sufficient IgG absorption (Muns et al., 2014). IgG capture can be measured indirectly by registering IgG levels from piglet serum after birth (Svendsen et al., 2005). There is also the possibility that low immunoglobulin serum concentrations among piglets may result from absorption failures, which is related to the intestinal maturation of the piglet. However, the amount of colostrum consumed by piglets and the amount of immunoglobulin presented to the intestine for absorption is unknown (Danielsen et al., 2011; Danielsen et al., 2006).

Finally, absorption efficiency decreases when the ingestion of the first colostrum is delayed, indicating the importance of ingesting colostrum immediately after birth. Even more important is the transmigration of pathogenic bacteria that can be avoided with colostrum by “closing the intestine” in the intestinal lumen. In cattle, the absorption efficiency of IgM decreases as ingestion increases, such that the ingestion of a greater amount of IgM does not increase the absolute amount that is absorbed (Stott et al., 1978). The results regarding levels of IgM in the milk replacer group at 28 days suggest that the evolution in concentration of this immunoglobulin is related to an immunity maturation in the piglets, considering that these animals did not ingest colostrum.

The immunology of the intestinal mucosa is highly complex, given that the surface of the mucosa is not only a predominant factor in the structural and immunological barrier against microorganisms, but also has an important role in the water and nutrient absorption during the digestive process (Cerutti et al., 2011). In fact, the view intestinal epithelium has an important role in the absorption of colostrum IgG, and likely IgA and IgM for neonatal circulation. It also has specialized role for the epithelium of the intestinal crypt in the adsorption of colostrum IgA and IgM (Butler et al., 1981). It is important to note that dimeric IgA and pig colostrum IgM offer a “first antiseptic layer” for the intestine, avoiding the transmigration of pathogenic bacteria (Butler et al., 1981; Clarke & Hardy, 1971; Rooke & Bland, 2002). Moreover, we observed in this studip present

results that piglets deprived from the ingestion of colostrum in the first 24 hours of their lives and fed only with milk substitutes during the colostrum phase presented high serum concentrations of IgA at 24 hours of life, which were significantly higher than the concentrations observed for piglets in the groups that received colostrum. Levast et al., 2010, suggested that ultra-early weaning directly influences the synthesis of IgA, activates, directly or indirectly, the Th17 pathways, and may be related to alterations in the functions of the mucosa barrier. On the other hand, a delay in weaning allows that endogenous factors of the milk stimulate the beginning of IgA synthesis, protecting the piglet. Thus, we suggest that the milk substitute stimulated an early synthesis of IgA by the piglet itself. It is likely that a component of the milk substitute acted as an antigen and was transferred to duodenal M cells for the intraepithelial lymphocytes, stimulating the plasma cells of the mucosa to secrete IgA (Cerutti et al., 2011). This increasing was transient and was only observed while animals received the milk replacement. In the lactogenesis phase, no difference was observed among the piglets.

As demonstrated in our study, corroborating previous efforts, no artificial nursing system using formula and milk replacers can reproduce the functions and characteristics in a pig's organism as maternal colostrum (Zabielski et al., 2008). In this context, the study also assessed the influence of different diets in the first 24 hours of life and cell immune development in piglets.

In this study, colostrum and plasma cytokines levels in dams and their and here is absorption into the offspring circulation before gut closure taking place and mammary secretion changes from colostrum to mature milk. Our understanding of early life ontogeny of piglet plasma cytokine and chemokine concentrations is limited. In humans, these concentrations can be affected by maturation as well as infectious and/or inflammatory states (Bernstein & Murasko, 1998; Chauhan et al., 2017; Decker et al., 2017a; Decker et al., 2017b; Machado et al., 2014). Colostrum and plasma concentrations of Th1, Th2 or Th17 cytokines were higher in sow than in gilt, as well as piglets that suckled sow colostrum also showed higher concentrations of these cytokines in their plasma than piglets that suckled gilt colostrum and piglets fed milk replacer. The production of GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α was stronger in all piglet groups that suckled sow colostrum. But even to piglet groups suckled gilt colostrum, the group produced less than half of the amount of GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α as compared to SS and GS groups (sow colostrum). This lower cytokines concentration was the same for

piglet groups fed milk replacer. Piglets show higher colostrum-related innate cytokine responses (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10) to dam multiparous. This innate maturation corresponds to a parallel increase in adaptive Th1 (IFN- γ) responses to mitogens.

Th cells are a type of T-lymphocytes and their proliferation is capable of turning into effector T-cells which subsequently differentiate into two distinctive subtypes, Th1 and Th2-lymphocytes cells (Foussat et al., 2003). Besides, Th cells enhance or potentiate the activity of other immune cells by releasing T cell cytokines. Th1-supporting IL-2, IFN- γ and TNF- α cytokine production are involved in cellular immunity, while Th2 lymphocytes characterized by the production of IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 are mainly involved in humoral immunity. Th17 lymphocytes known to produce IL-6 (Crawley et al., 2003).

We then examined the relationship between early innate immune responses and the source of feed in suckling piglets. A greater propensity for innate inflammatory and anti-inflammatory responses in the perinatal period was significantly correlated with the piglets suckled sow colostrum, as SS and GS groups, along with propensity for specific Th1 and Th2 responses in the early postnatal period. Specifically, there were consistent positive correlations between the level of inflammatory cytokine responses at 24 hours of life and the development of IL-6, IL-12, IL-18, IL- β but also for TNF- α . This was also particularly true for anti-inflammatory cytokine IL-10 production. Our results are consistent with previous studies (Laskowska et al., 2019), which demonstrated that probiotics used in pigs induces higher production of Th1 pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory and immunoregulatory cytokines. In contrast, piglets fed milk replacer are associated with significantly increased concentrations for IL-1ra and IL-8. IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) is an anti-inflammatory agent that reduces inflammation by blocking the binding of the agonist receptor ligands (Nedumpun et al., 2019). Probably, some properties of the milk replacer composition may be antigenic and supplementary analysis may be useful to detect the degree of immune reactivity against antigens of these products. We thus observed that sow parity is correlated with colostrum and plasma cytokine concentrations. Colostrum and plasma cytokine concentrations from the dam have an improvement in the immunological quality of colostrum with immunomodulatory effect and is a strong driver of porcine neonatal ontogeny.

After piglet birth, the immune system begins to transition towards a microbe-rich extra-uterine environment. Nevertheless, the development of active cellular immunity in the piglet is immature at birth (Hammerberg et al., 1989). Consistent with other studies,

the ability of B and T cells from lymphatic organs and blood mononuclear cells to respond to mitogens was less developed in the neonate piglet and the number of antigen-presenting cells was lower (Becker & Misfeldt, 1993). The capacity to active proliferation and clonal expansion of T and B cells that is required for the generation of adaptive immune responses demonstrated differences in levels between suckling piglet groups of sow colostrum, gilt colostrum and milk replacer; activated B and T cells were higher in piglets breastfed with sow colostrum in the neonatal period (24 hours) and then with sow mature milk in the weaning period (28 days).

In offspring, we do not yet know whether tolerance can be generated by additional antigen from components of another dam's colostrum or milk replacer. We did not observe in piglets suckled with another dam's colostrum or milk replacer an increase in regulatory T cells with cytokine production from suckling, which induce the production of regulatory cells which may survive as long-lived memory T cells. The pigs fed with milk replacer (GMR and SMR groups) showed a little inability of lymphocytes to respond to mitogens at 24 hours until 28-days suggests that immune cells are mainly immature populations, whereas the piglets suckled sow/gilt colostrum showed greater amounts of mitogen-stimulated lymphocytes. We observed the IgG concentrations in the piglet plasma shortly after birth are positively correlated with survival (Hendrix et al., 1978) and, in addition, dead piglets had lower serum IgG concentrations than comparable surviving piglets (Drew & Owen, 1988; Klobasa et al., 1981; Rooke & Bland, 2002). Our study substantiates the aspect of an immune deficiency for immune cells and cytokine production in neonates, so we demonstrated it in piglets fed with milk replacer. In addition, our study is also the first to document the influence of the sow colostrum on the increase in activated B and T cells, as well as pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokines secretion capacity that evolves in parallel with Th1 and Th2 maturation over time. Naive T cells do not secrete Th1, Th2 and Th17 cytokines, consequently, changes in cytokine concentrations secreted by Th1 or Th2 cells are associated with altered proportions of lymphocyte subpopulations and antigen-driven T cell differentiation.

Furthermore, the trajectories between the first week of life and the remainder of the piglet's vulnerable neonatal period, defined as the first 28 days of life, observed that the immune ontogeny does not remain consistent. Whether this early impact on piglet life will affect performance is a key question in the field of immune ontogeny and will require further studies. It is assumed that our findings help define the baseline trajectories of

plasma cytokines in neonates piglets and will help to correlate plasma, in future studies, and cytokines with immune response challenges such as immunization.

Materials and Methods

Animals. This study was performed in compliance with the Animal Use Ethics Committee of Embrapa Swine and Poultry (protocol number 001/2016). This study was conducted on nine crossbred Landrace 3Large White (LR3LW) dams. All sows were housed individually on a slatted floor during gestation. Seven days before the expected farrowing, dams were transferred from gestation to the farrowing room. Sows had free access to water and were fed twice a day on a traditional gestation diet. The gestation diet was provided until the second day of lactation.

A total of 30 candidate sows (20 sows and 10 gilts) with similar expected delivery dates were selected and prostaglandin F2 alpha was administered at 6:00 AM on day 113 of gestation to ensure synchronous delivery. Candidate sows/gilts were excluded if the difference in delivery time was more than 1 hour. In total, five synchronously delivering multiparous sows (parity = 4~6) and four primiparous gilts were selected for this study. All sows were examined (feed intake, rectal temperature, vulval discharge and milk production) to exclude the possibility of puerperal disorders, mainly mastitis-metritis-agalactia syndrome. The day of parturition (just after the birth of the first piglet) was considered the day 0 (D0) of the experiment. Some piglets from these nine dams remained with their dam and others were relocated, and thus six groups were formed:

Table 2. Division of experimental groups

Groups	Description	N°
GG	piglets were kept with their own gilts and allowed to suckle as normal	10
GS	piglets were changed from gilts to sow and allowed to suckle as normal	10
GMR	piglets from gilt were isolated from the dams and kept in containers under temperature control. Piglets were bottle-fed milk replacer for pigs every 1 hour during the first 24 hours of life	6
SS	piglets were kept with their own sows and allowed to suckle as normal	10
SG	piglets were changed from sow to gilt and allowed to suckle as normal	10

GMR	piglets from sow were isolated and placed in the same condition as the GMR group	8
-----	--	---

Piglets remained in the groups during the first 24 hours of life and were later returned to their respective mothers. Blood and colostrum samples were collected from nine sows on D1 postpartum. Piglet's serum samples were collected on D1 and D28 after birth.

Colostrum was manually collected from all functional teats, after the birth of the first piglet (D0) and before suckling. To minimize the contamination of colostrum and milk, the sow's teats were previously scrubbed with iodine alcohol, handled wearing disposable latex gloves and the samples were stored into sterile 50mL conical tubes (Pereira et al., 2021). Colostrum and milk samples were centrifuged for 20 minutes (1300xg at room temperature) and the upper-fat layer was discarded. After the initial treatment, serum and colostrum samples were stored at -80°C for further analysis. On D1 and D28, 5 piglets from all groups were euthanized. At necropsy, spleen, thymus and mesenteric lymph nodes were collected in RPMI 1640 medium supplemented with 1x penicillin, streptomycin and fungizone.

Immunoglobulin and cytokines quantification in colostrum and serum samples. IgA, IgG and IgM titers in colostrum and serum samples were determined using ELISA kits for porcine IgA, IgG and IgM quantification (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX), which were quantified according to Forner et al. (2021). The concentrations of 13 cytokines were measured in undiluted colostrum and serum samples by Porcine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Assay (MILLIPLEX®MAP, Cat#PCYTMG-23K-13PX, Merck Millipore), following the manufacturer's recommendations. The quantified cytokines/chemokines were granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon-gamma (IFN γ), IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 and tumor necrosis factor- α (TNF α). The plates were run on a MAGPIX® analyzer (Luminexcorp, Austin, TX, USA). The xPONENT version 4.2 (Luminexcorp) and MILLIPLEX® Analyst Version 5.1 (Merck Millipore) were used for acquisition and data analysis, respectively. The median fluorescence intensity, analyzed using a 5-parameter logistic curve fit, was used to calculate cytokine concentrations, which were expressed in pg/mL.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Heparinized blood samples were diluted 1:3 (v/v) in PBS and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque, GE Healthcare), following the manufacturer's recommendations. The PBMCs were cryopreserved in 95% fetal bovine serum (FBS) + 5% Dimethyl sulfoxide (DMSO).

Isolation of white-blood cells from spleen, thymus, and mesenteric lymph node.

The piglets were euthanized and spleen, thymus and mesenteric lymph nodes from each piglet at predetermined time points (D1 and D28) were isolated under aseptic conditions. The isolated tissues were individually disrupted with the plunger of a 1ml syringe against a 100µm cell strainer to get single-cell suspension and collected in HBSS + 2% FBS. Then, the cells were filtered to avoid tissue debris by passing cell suspension through a 70µm Nylon Cell strainer, so were centrifuged single-cell suspensions at 300xg for 10 minutes at 4°C. After that, the cells were resuspended with Pharm Lyse™ buffer (BD Biosciences) to lyse red blood cells at room temperature. Stopped lysis reaction by adding 10 volumes of RPMI 1640 medium + 2% FBS and were centrifuged at 300xg for 10 minutes at room temperature. The cells were washed twice, then the supernatant were discarded and the cells were resuspended in complete RPMI 1640 medium, and the cell number was counted with 0.4% Trypan blue to determine the viable cell concentration. The cells were resuspended and cryopreserved in 95% FBS + 5% DMSO at a final concentration of 2×10^6 cells/ml.

Cell proliferation assay. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) in combination with monoclonal antibodies (mAbs) enabled the concomitant determination of cell proliferation and activation status of cell subpopulations. The viable cells from the spleen, thymus, mesenteric lymph node and PBMCs were thawed and suspended to the concentration of 5×10^6 cells/mL in DPBS and labeled with CFSE (2.5µM; CellTrace CFSE Cell Proliferation kit, Invitrogen) for 15 minutes at 37°C in the dark, and then the labeling process was stopped by the addition of ice-cold RPMI 1640 supplemented with 10% FBS followed by incubation for 5 minutes in an ice bath, in the dark. Finally, the cells were washed two times with RPMI-FBS and further suspended in complete RPMI 1640 medium, this medium was supplemented with 10% FBS (Gibco), 1mM GlutaMAX (Gibco), 25mM HEPES (Sigma-Aldrich), 1mM sodium pyruvate

(Sigma-Aldrich), 50M 2-mercaptoethanol (Gibco) and 100U/mL penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich).

The cells were plated in 24-well plates (5×10^6 cells/well) and cultured for 96 hours with complete RPMI 1640 medium at 37°C under 5% CO₂, and *in vitro* mitogens stimulation occurred with 5µg/mL of Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich) (Joling et al., 1993).

After 96 hours of cultured, the cells from organ lymphatic (spleen, thymus and mesenteric lymph node) were visualized using microscopy (EVOS M7000, Thermo Fisher Scientific), then were quantified, suspended in a flow cytometry buffer (1×10^6), transferred to flow cytometry tubes and labeled for 30 minutes at room temperature with a cocktail of specific mAbs. For flow cytometry were purchased antibodies raised against porcine leukocyte antigens and isotype controls (BioRad Serotec, Oxford, UK), stabilizing fixative, and compensation beads from BD (North Ryde, Australia). Our flow cytometry panel was performed for a 4-color panel to assess lymphocyte and monocyte-macrophage cell populations. The following fluorochrome-labeled mAbs were used: panel A): 7-AAD (BD Biosciences), RPE-macrophages (clone BA4D5); panel B): RPE-CD4alpha (clone MIL17), PE-Cy7-CD8alpha (clone MIL12), APC-CD3 (clone PPT3); panel C): RPE-CD4alpha (clone MIL17), PE-Cy7-CD25 (clone K2313B2), APC-CD3 (clone PPT3); panel D): RPE-CD4alpha (clone MIL17), PE-Cy7-CD3 (clone PPT3), APC-SWC2 (ou CD27, clone B30C7); panel E): RPE-CD8alpha (clone MIL12), PE-Cy7-CD3 (clone PPT3), APC-SWC2 (ou CD27, clone B30C7); panel F): PE-Cy7-SWC7 (or CD19, clone CC55), RPE-CD79a (clone MB-1). For PBMC were used: panel A): 7-AAD (BD Biosciences); panel B): RPE-CD79a (clone MB-1), PE-Cy7-SWC7 (or CD19, clone CC55); panel C): RPE-CD4alpha (clone MIL17), PE-Cy7-CD8alpha (clone MIL12), APC-CD3 (clone PPT3).

For intracellular staining, the cells were treated with the Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit (BD), according to the manufacturer's instructions, and stained with CD79a, macrophages and CD3 mAbs. The antibodies used in the staining were previously titrated for their optimum concentrations (Forner et al., 2021). A total of 50,000 events per tube was acquired on the flow cytometer (Accuri C6plus and FACSCanto, Becton-Dickinson, USA) and analyzed with the aid of the software FlowJo (Becton-Dickinson, USA). The lymphocyte and macrophage gate was set on light-scatter properties (forward scatter vs. side scatter). Proliferation by CFSE (reflected by

successive diminution of fluorescence intensities by dye distribution to daughter cells) was measured by flow cytometry. The results were expressed as counts of stained cells.

Statistical analysis. Comparisons among groups were performed using the Kruskal-Wallis test. Statistical analyses were carried out using the NPAR1WAY procedure of SAS (2012). Data are expressed as the mean \pm standard error. Significance was declared at $p \leq 0.05$.

Table 2. Mean concentration of immunoglobulins (mg/mL) in piglets serum in different experimental groups

Ig	Groups						Pr> χ^2
	GG	GS	GMR	SS	SG	SMR	
24 hours							
IgA	1.983 \pm 0.12 ^a	3.782 \pm 0.57 ^b	9.780 \pm 1.05 ^c	3.294 \pm 0.71 ^b	2.326 \pm 0.41 ^a	10.92 \pm 0.19 ^c	<0.0001
IgG	22.32 \pm 2.05 ^a	25.00 \pm 1.55 ^b	0.000 \pm 0.00 ^c	27.81 \pm 1.23 ^b	23.54 \pm 1.37 ^a	0.000 \pm 0.00 ^c	<0.0001
IgM	3.025 \pm 0.63 ^a	1.976 \pm 0.18 ^b	0.000 \pm 0.00 ^c	1.876 \pm 0.14 ^b	3.025 \pm 0.71 ^a	0.000 \pm 0.00 ^c	<0.0001
28 days							
IgA	3.960 \pm 0.69	8.346 \pm 1.43	9.461 \pm NA	12.06 \pm 6.21	7.316 \pm 1.42	6.055 \pm 4.83	0.3845
IgG	7.723 \pm 0.83	7.521 \pm 0.84	1.340 \pm NA	7.387 \pm 0.58	7.242 \pm 1.99	7.576 \pm 0.73	0.7160
IgM	1.058 \pm 0.21	1.091 \pm 0.26	0.923 \pm NA	1.467 \pm 0.15	1.045 \pm 0.27	2.802 \pm 0.22	0.0597

Error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). The analysis was performed with the Kruskal-Wallis tests. ^{a, b, c, d} Different superscript letters indicate the significant statistical difference between ($p \leq 0.05$).

Table 3. Levels of plasma cytokines (ng/mL) in piglet groups. Data are shown as Mean \pm SEM.

Cytokine	Group						Pr> χ^2
	GG	GS	GMR	SS	SG	SMR	
GM-CSF	0.058 \pm 0.032 ^b	0.746 \pm 0.278 ^a	0.014 \pm 0.010 ^b	0.918 \pm 0.452 ^a	0.054 \pm 0.011 ^b	0.012 \pm 0.012 ^b	0.0004
IFN-γ	33.44 \pm 7.50 ^b	169.04 \pm 56.2 ^a	4.084 \pm 2.033 ^c	294.80 \pm 50.2 ^a	22.01 \pm 10.6 ^{bc}	13.37 \pm 6.99 ^{bc}	0.0004
IL-1α	0.192 \pm 0.098 ^b	0.604 \pm 0.108 ^a	0.006 \pm 0.004 ^c	0.744 \pm 0.146 ^a	0.280 \pm 0.132 ^{ab}	0.006 \pm 0.006 ^c	0.0003
IL1β	0.382 \pm 0.222 ^b	1.414 \pm 0.384 ^a	0.012 \pm 0.002 ^b	1.978 \pm 0.597 ^a	0.636 \pm 0.358 ^b	0.164 \pm 0.154 ^b	0.0024
IL-1RA	13.79 \pm 3.51	10.48 \pm 2.90	34.29 \pm 22.5	5.912 \pm 1.436	22.89 \pm 8.74	30.48 \pm 26.9	0.3699
IL-2	1.462 \pm 0.586 ^b	4.582 \pm 0.889 ^a	0.100 \pm 0.044 ^c	6.306 \pm 1.701 ^a	1.886 \pm 0.357 ^b	0.116 \pm 0.096 ^c	0.0002
IL-4	24.54 \pm 14.7 ^b	107.77 \pm 20.6 ^a	0.086 \pm 0.048 ^c	176.61 \pm 25.5 ^a	52.62 \pm 11.5 ^b	0.084 \pm 0.064 ^c	0.0002
IL-6	0.434 \pm 0.256 ^b	2.062 \pm 0.339 ^a	0.042 \pm 0.027 ^b	3.326 \pm 1.280 ^a	0.636 \pm 0.376 ^b	0.034 \pm 0.034 ^b	0.0013
IL-8	0.242 \pm 0.051 ^c	0.476 \pm 0.087 ^{abc}	0.788 \pm 0.145 ^a	0.512 \pm 0.087 ^{ab}	0.228 \pm 0.060 ^{bc}	0.764 \pm 0.275 ^{abc}	0.0407
IL-10	6,896 \pm 3.721 ^c	27.59 \pm 6.41 ^b	0.224 \pm 0.088 ^d	47.47 \pm 4.69 ^a	13.72 \pm 2.76 ^c	0.214 \pm 0.123 ^d	0.0002
IL-12	0.996 \pm 0.320 ^b	2.624 \pm 0.033 ^a	0.362 \pm 0.027 ^b	3.514 \pm 0.708 ^a	1.134 \pm 0.486 ^b	0.420 \pm 0.064 ^b	0.0014
IL-18	7.086 \pm 3.473 ^{bc}	24.02 \pm 2.80 ^a	0.498 \pm 0.213 ^{cd}	33.71 \pm 8.45 ^a	9.458 \pm 4.280 ^b	0.472 \pm 0.263 ^d	0.0004
TNF-α	0.202 \pm 0.070 ^b	2.348 \pm 0.833 ^a	0.160 \pm 0.061 ^b	3.044 \pm 1.190 ^a	0.280 \pm 0.071 ^b	0.130 \pm 0.076 ^b	0.0008

The analysis was performed with the Kruskal-Wallis tests. ^{a, b, c, d} Different superscript letters indicate the significant statistical difference between ($p \leq 0.05$).

Table 4. Stimulation proliferation index for lymphocytes from peripheral blood among all groups and experimental conditions.

Immune Cells		Piglet Groups						Pr> χ^2
		GG	GS	GMR	SS	SG	SMR	
		24 hours						
B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	292.6±40.6 ^{cd}	562.8±33.1 ^b	165.2±24.5 ^e	724.1±37.2 ^a	377.9±14.2 ^c	199.7±6.8 ^{de}	<0.0001
T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	193.13±19.2 ^{de}	402.00±24.6 ^b	219.33±8.74 ^d	539.78±43.6 ^a	269.00±11.6 ^c	164.33±8.53 ^e	<0.0001
	CD3e ⁺ CD8 α ⁺	74.63±4.25 ^d	198.60±21.4 ^b	78.50±9.50 ^d	548.33±34.1 ^a	137.50±4.33 ^c	75.83±7.77 ^d	<0.0001
		28 days						
B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	1338±46 ^b	1399±36 ^b	224.00±NA	2089±91 ^a	1461±37 ^b	1167±43 ^c	0.0027
T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	1569±32 ^c	1723±74 ^{bc}	1294±NA	2750±77 ^a	1886±63 ^b	1627±53 ^c	0.0020
	CD3e ⁺ CD8 α ⁺	476.20±24.6 ^e	982.40±31.5 ^c	145.00±NA	2404±77 ^a	1213±52 ^b	616.00±30.5 ^d	0.0005

The analysis was performed with the Kruskal-Wallis tests and data are shown as Mean \pm SEM. ^{a, b, c, d} Different superscript letters indicate the significant statistical difference between ($p \leq 0.05$).

Stimulation proliferation (S.I.) index was determined by CFSE dilution and the geometric mean values of the concanavalin A-stimulated duplicates were calculated and divided with the geometric mean values of the PBMC-nonstimulated control duplicates.

Table 5. Stimulation proliferation index for lymphocytes from lymphoid organs at 24 hours of age.

Organ lymphatic	Immune cells	Groups – 24 hours						Pr> χ^2	
		GG	GS	GMR	SS	SG	SMR		
Spleen									
	B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	2029±260 ^b	2425±190 ^b	1549±387 ^b	2860±196 ^a	2040±169 ^b	1609±338 ^b	0.0574
	T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	2447±134 ^b	3544±133 ^{ac}	1904±210 ^b	3897±228 ^a	2641±82 ^d	2362±425 ^{bcd}	0.0017
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	254.00±18.1 ^{bc}	266.60±15.8 ^b	197.20±9.3 ^c	294.80±52.4 ^{ab}	396.80±38.9 ^a	172.00±25.4 ^c	0.0091
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺	162.80±11.5 ^b	231.20±28.4 ^a	142.20±12.0 ^b	280.60±30.4 ^a	206.80±3.95 ^a	121.80±42.4 ^b	0.0036
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺	808.20±220 ^b	478.20±23.2 ^c	238.60±19.9 ^c	1453±226 ^a	378.40±74.8 ^c	471.00±56.3 ^c	0.0009
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺ CD27 ⁺	84.20±9.83 ^b	60.80±11.9 ^{bc}	40.80±3.79 ^c	175.40±49.1 ^a	151.40±20.1 ^a	99.60±10.2 ^{ab}	0.0005
	Myeloid cells	Macrophage ⁺	941.40±51.6 ^a	770.80±30.3 ^b	443.00±53.6 ^c	890.00±34.5 ^a	759.20±84.1 ^{ab}	531.00±61.8 ^c	0.0007
Thymus									
	B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	300.20±35.2 ^c	442.00±54.1 ^b	125.60±10.6 ^d	699.60±18.2 ^a	386.60±13.9 ^{bc}	103.60±7.66 ^d	0.0001
	T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	403.40±19.9 ^b	876.40±57.1 ^c	401.60±35.8 ^b	1150±50.0 ^a	527.00±22.6 ^d	374.00±18.5 ^b	0.0002
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	123.20±12.6 ^b	194.00±4.74 ^c	75.80±9.37 ^d	347.00±22.6 ^a	158.20±4.14 ^e	51.00±1.79 ^f	<.0001
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺	117.00±4.11 ^b	679.00±18.2 ^c	47.00±4.15 ^d	993.00±58.6 ^a	258.40±22.5 ^e	24.80±1.46 ^f	<.0001
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺	549.00±32.9 ^b	435.40±49 ^c	219.00±18.7 ^d	1339±178 ^a	682.20±59.6 ^b	283.40±3.85 ^c	0.0002
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺ CD27 ⁺	301.20±5.87 ^b	230.20±6.31 ^c	148.20±37.3 ^{cd}	674.00±18.0 ^a	236.80±9.54 ^c	86.40±21.2 ^d	<.0001
	Myeloid cells	Macrophage ⁺	109.00±9.77 ^b	389.00±26.3 ^c	56.80±2.58 ^d	319.60±22.0 ^a	251.40±12.0 ^e	72.40±4.40 ^f	<.0001
mLN									
	B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	1047±45 ^{bd}	996.00±57.3 ^{cd}	840.00±46.5 ^c	2740±182 ^a	1464±64 ^c	1273±106 ^{bc}	0.0002
	T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	2372±174 ^{bc}	2058±132 ^b	2166±345 ^b	4011±350 ^a	2971±164 ^c	2250±418 ^b	0.0062
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	315.60±20.0 ^b	340.00±24.0 ^b	299.60±54.5 ^b	846.20±33.4 ^a	461.80±40.4 ^c	484.00±35.2 ^c	0.0007
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺	224.80±19.3 ^{bc}	230.20±25.5 ^b	158.60±22.6 ^c	375.60±27.9 ^a	197.60±12.8 ^{bc}	162.60±19.6 ^c	0.0031
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺	2084±24 ^a	1583±114 ^b	532.20±39.4 ^c	2121±120 ^a	1585±61 ^b	1364±149 ^b	0.0002
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺ CD27 ⁺	419.60±42.7 ^{abc}	362.00±47.1 ^{bc}	258.20±71.4 ^{bc}	653.80±96.7 ^a	592.20±53.4 ^a	282.40±34.6 ^c	0.0056
	Myeloid cells	Macrophage ⁺	181.40±14.9 ^b	295.60±26.6 ^c	165.80±25.5 ^b	619.20±48.5 ^a	354.20±30.9 ^c	167.80±18.2 ^b	0.0002

The analysis was performed with the Kruskal-Wallis tests and data are shown as Mean \pm SEM. ^{a, b, c, d} Different superscript letters indicate the significant statistical difference between ($p \leq 0.05$).

Stimulation proliferation (S.I.) index was determined by CFSE dilution and the geometric mean values of the concanavalin A-stimulated duplicates were calculated and divided with the geometric mean values of the PBMC-nonstimulated control duplicates.

Table 6. Stimulation proliferation index for lymphocytes from lymphoid organs at weaning period (28 days of age).

Organ lymphatic	Immune cells	Groups – 28 days						Pr> χ^2	
		GG	GS	GMR	SS	SG	SMR		
Spleen	B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	3579± 162 ^b	4996± 448 ^c	3804±NA ^b	8462± 674 ^a	7817± 587 ^a	8074± 692 ^a	0.0028
	T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	8412±1230 ^a	12366±1400 ^b	3112±NA ^c	11752± 579 ^{ab}	10579±1031 ^{ab}	3974± 495 ^c	0.0156
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	610.40±71.7 ^{ab}	351.80±32.7 ^c	300.00±NA ^c	627.00±51.5 ^a	462.20±30.5 ^{bd}	341.33±17.3 ^c	0.0036
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺	293.60±45.9 ^b	693.80±39.4 ^c	170.00±NA ^d	564.20±37.2 ^a	391.40±58.5 ^{bd}	194.67±12.6 ^d	0.0020
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺	751.00± 260 ^b	2793± 304 ^{ac}	827.00±NA ^b	1976± 152 ^{ad}	2753± 322 ^c	1844± 97 ^d	0.0023
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺ CD27 ⁺	141.40±11.4 ^a	106.60±16.4 ^b	29.00±NA ^c	223.40±34.8 ^a	155.60±23.3 ^a	150.67±48.2 ^a	0.1289
	Myeloid cells	Macrophage ⁺	1687±50 ^b	1475±63 ^c	320,00±NA ^d	2146±106 ^a	1814±44 ^b	1317± 94 ^c	0.0012
Thymus	B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	3532± 394 ^b	4315± 528 ^b	4163±NA ^b	8954± 858 ^a	8034± 605 ^a	5237± 606 ^b	0.0026
	T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	3255±79 ^b	4002± 144 ^c	3061±NA ^b	10266±814 ^a	3821±92 ^c	3172±265 ^b	0.0015
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	426.20±25.2 ^a	366.00±13.9 ^b	314.00±NA ^b	648.40± 113 ^a	388.00±65.7 ^b	269.33±39.7 ^b	0.0493
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺	100.20±3.72 ^b	278,60±61.1 ^{bc}	73,00±NA ^b	647.20±23.1 ^a	241.40±14.6 ^c	73.67±4.91 ^d	0.0015
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺	2702± 201 ^b	3722± 127 ^{ac}	2028±NA ^b	3329± 175 ^a	3836± 113 ^c	3164± 301 ^{ab}	0.0114
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺ CD27 ⁺	779.00±33.7 ^b	517.00±114 ^c	430.00±NA ^c	5372±175 ^a	3331±877 ^d	1136±75 ^d	0.0012
	Myeloid cells	Macrophage ⁺	355.60± 122 ^b	498.00±90.3 ^b	259.00±NA ^b	650.80± 230 ^b	745.40± 221 ^b	99.33±33.9 ^a	0.0684
mLN	B cells	SWC7 ⁺ CD79a ⁺	4338±707 ^{ab}	4648±221 ^a	3840±NA	4723±103 ^a	4642±223 ^a	3019±412 ^b	0.0685
	T cells	CD3e ⁺ CD4 ⁺	2904±143 ^b	3106±158 ^b	6370± NA	4752±400 ^a	3498±275 ^b	2573±702 ^b	0.0245
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	486.80±41.9 ^b	388.00±35.7 ^c	113.00±NA	1145± 97 ^a	731.00±27.5 ^d	322.33±74.0 ^c	0.0015
		CD3e ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺	296.80±21.1 ^b	315.20±5.44 ^b	387.00±NA	595.00±15.2 ^a	438.00±34.8 ^c	361.00±23.8 ^{bc}	0.0019
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺	2131±129 ^b	2354± 96 ^b	987.00±NA	4163± 89 ^a	2203±160 ^b	1289±291 ^c	0.0032
		CD3e ⁺ CD8 α ⁺ CD27 ⁺	661.40±26.8 ^a	346.00±35.2 ^c	153.00±NA	815.00±75.1 ^a	560.20±22.0 ^d	408.67±146 ^{cd}	0.0059
	Myeloid cells	Macrophage ⁺	278.00±21.0 ^b	369.00±43.2 ^{bc}	341.00±NA	1797± 152 ^a	836.80±82.6 ^d	506.00±69.3 ^c	0.0011

The analysis was performed with the Kruskal-Wallis tests and data are shown as Mean ± SEM. ^{a, b, c, d} Different superscript letters indicate the significant statistical difference between (p≤0.05).

Stimulation proliferation (S.I.) index was determined by CFSE dilution and the geometric mean values of the concanavalin A-stimulated duplicates were calculated and divided with the geometric mean values of the PBMC-nonstimulated control duplicates.

Acknowledgments

We thank the study participants, our colleagues at Embrapa Suínos e Aves, including Cleiton Schuck, Adilson Schell, Clair Klassmann, Ademir Muller, Hedo Haupt, José Bach, Lauri Lavrenz, Neori Gonçalves, Neudi Romani, Neudir Gastmann, Valdir Hegler and Valdori Petry for their technical assistance and data collection. The authors wish to thank the Omic Technologies Center - FCF/USP for the cytokine analysis and Embrapa for financial support (13.16.05.031.00.00).

Reference

- BALZANI, A., CORDELL, H. J., SUTCLIFFE, E. & EDWARDS, S. A. (2016). Heritability of udder morphology and colostrum quality traits in swine. *Journal of Animal Science*, 94(9), 3636-3644.
- BECKER, B. A. & MISFELDT, M. L. (1993). Evaluation of the Mitogen-Induced Proliferation and Cell-Surface Differentiation Antigens of Lymphocytes from Pigs 1 to 30 Days of Age. *Journal of Animal Science*, 71(8), 2073-2078.
- BERNSTEIN, E. D. & MURASKO, D. M. (1998). Effect of age on cytokine production in humans. *Age*, 21(4), 137-151.
- BLAND, I. M., ROOKE, J. A., BLAND, V. C., SINCLAIR, A. G. & EDWARDS, S. A. (2003). Appearance of immunoglobulin G in the plasma of piglets following intake of colostrum, with or without a delay in sucking. *Animal Science*, 77, 277-286.
- BUTLER, J. E. (1998). Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 17(1), 43-70.
- BUTLER, J. E., KLOBASA, F. & WERHAHN, E. (1981). The Differential Localization of Iga, Igm and Igg in the Gut of Suckled Neonatal Piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2(1), 53-65.
- CARNEY-HINKLE, E. E., TRAN, H., BUNDY, J. W., MORENO, R., MILLER, P. S. & BURKEY, T. E. (2013). Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2885-2893.
- CERUTTI, A., CHEN, K. & CHORNY, A. (2011). Immunoglobulin Responses at the Mucosal Interface. *Annual Review of Immunology*, Vol 29, 29, 273-293.
- CERVENAK, J. & KACSKOVICS, I. (2009). The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3), 171-177.
- CHAUHAN, N., TIWARI, S. & JAIN, U. (2017). Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microbial Pathogenesis*, 107, 234-242.
- CLARKE, R. M. & HARDY, R. N. (1971). Histological Changes in Small Intestine of Young Pig and Their Relation to Macromolecular Uptake. *Journal of Anatomy*, 108(Jan), 63-&.

- CRAWLEY, A., RAYMOND, C. & WILKIE, B. N. (2003). Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(2), 141-154.
- DANIELSEN, M., PEDERSEN, L. J. & BENDIXEN, E. (2011). An in vivo characterization of colostrum protein uptake in porcine gut during early lactation. *Journal of Proteomics*, 74(1), 101-109.
- DANIELSEN, M., THYMAN, T., JENSEN, B. B., JENSEN, O. N., SANGILD, P. T. & BENDIXEN, E. (2006). Proteome profiles of mucosal immunoglobulin uptake in inflamed porcine gut. *Proteomics*, 6(24), 6588-6596.
- DECKER, M. L., GOTTA, V., WELLMANN, S. & RITZ, N. (2017a). Cytokine profiling in healthy children shows association of age with cytokine concentrations. *Scientific Reports*, 7.
- DECKER, M. L., GROBUSCH, M. P. & RITZ, N. (2017b). Influence of Age and Other Factors on Cytokine Expression Profiles in Healthy Children - A Systematic Review. *Frontiers in Pediatrics*, 5.
- DEVILLERS, N., FARMER, C., LE DIVIDICH, J. & PRUNIER, A. (2007). Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs. *Animal*, 1(7), 1033-1041.
- DREW, M. D. & OWEN, B. D. (1988). The Provision of Passive-Immunity to Colostrum-Deprived Piglets by Bovine or Porcine Serum Immunoglobulins. *Canadian Journal of Animal Science*, 68(4), 1277-1284.
- FARMER, C. & QUESNEL, H. (2009). Nutritional, hormonal, and environmental effects on colostrum in sows. *Journal of Animal Science*, 87(13 Suppl), 56-64.
- FERRARI, C. V., SBARDELLA, P. E., BERNARDI, M. L., COUTINHO, M. L., VAZ, I. S., JR., WENTZ, I. & BORTOLOZZO, F. P. (2014). Effect of birth weight and colostrum intake on mortality and performance of piglets after cross-fostering in sows of different parities. *Prev Vet Med*, 114(3-4), 259-266.
- FOISNET, A., FARMER, C., DAVID, C. & QUESNEL, H. (2010). Relationships between colostrum production by primiparous sows and sow physiology around parturition. *Journal of Animal Science*, 88(5), 1672-1683.
- FORNER, R., BOMBASSARO, G., BELLAVER, F. V., MACIAG, S., FONSECA, F. N., GAVA, D., LOPES, L., MARQUES, M. G. & BASTOS, A. P. (2021). Distribution difference of colostrum-derived B and T cells subsets in gilts and sows. *Plos One*, 16(5).
- FOUSSAT, A., COTTREZ, F., BRUN, V., FOURNIER, N., BREITTMAYER, J. P. & GROUX, H. (2003). A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *Journal of Immunology*, 171(10), 5018-5026.
- HAMMERBERG, C., SCHURIG, G. G. & OCHS, D. L. (1989). Immunodeficiency in Young-Pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 50(6), 868-874.
- HENDRIX, W. F., KELLEY, K. W., GASKINS, C. T. & HINRICHS, D. J. (1978). Porcine Neonatal Survival and Serum Gamma-Globulins. *Journal of Animal Science*, 47(6), 1281-1286.
- JENSEN, A. R., ELNIF, J., BURRIN, D. G. & SANGILD, P. T. (2001). Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. *Journal of Nutrition*, 131(12), 3259-3265.
- JOLING, P., WEVER, P. J. M., OSKAM, J. P. H. & HENKEN, A. M. (1993). Lymphocyte Stimulation by Phytohemagglutinin and Concanavalin-a in Different Swine Breeds. *Livestock Production Science*, 35(3-4), 341-350.
- KIELLAND, C., ROOTWELT, V., REKSEN, O. & FRAMSTAD, T. (2015). The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma (vol 93, pg 4453, 2015). *Journal of Animal Science*, 93(11), 5469-5469.
- KIM, Y. B. (1975). Developmental immunity in the piglet. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 11(1), 549-557.
- KLOBASA, F., BUTLER, J. E., WERHAHN, E. & HABE, F. (1986). Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet Immunol Immunopathol*, 11(2), 149-159.

- KLOBASA, F., WERHAHN, E. & BUTLER, J. E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Research in Veterinary Science*, 31(2), 195-206.
- KUMURA, B. H., SONE, T., SHIMAZAKI, K. & KOBAYASHI, E. (2000). Sequence analysis of porcine polymeric immunoglobulin receptor from mammary epithelial cells present in colostrum. *J Dairy Res*, 67(4), 631-636.
- LANGEL, S. N., PAIM, F. C., LAGER, K. M., VLASOVA, A. N. & SAIF, L. J. (2016). Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Research*, 226, 93-107.
- LASKOWSKA, E., JAROSZ, L. & GRADZKI, Z. (2019). Effect of Multi-Microbial Probiotic Formulation Bokashi on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Profile in the Serum, Colostrum and Milk of Sows, and in a Culture of Polymorphonuclear Cells Isolated from Colostrum. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(1), 220-232.
- LE DIVIDICH, J., ROOKE, J. A. & HERPIN, P. (2005). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *Journal of Agricultural Science*, 143, 469-485.
- LEVAST, B., DE MONTE, M., CHEVALEYRE, C., MELO, S., BERRI, M., MANGIN, F., ZANELLO, G., LANTIER, I., SALMON, H. & MEURENS, F. (2010). Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137(3-4), 261-268.
- MACHADO, J. R., SOAVE, D. F., DA SILVA, M. V., DE MENEZES, L. B., ETCHEBEHERE, R. M., MONTEIRO, M. L. G. D., DOS REIS, M. A., CORREA, R. R. M. & CELES, M. R. N. (2014). Neonatal Sepsis and Inflammatory Mediators. *Mediators of Inflammation*, 2014.
- MARKOWSKA-DANIEL, I. & POMORSKA-MOL, M. (2010). Shifts in Immunoglobulins Levels in the Porcine Mammary Secretions during Whole Lactation Period. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54(3), 345-349.
- MCCAULEY, I. & HARTMANN, P. E. (1984). Changes in piglet leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Research in Veterinary Science*, 37(2), 234-241.
- MUNS, R., SILVA, C., MANTECA, X. & GASA, J. (2014). Effect of cross-fostering and oral supplementation with colostrums on performance of newborn piglets. *Journal of Animal Science*, 92(3), 1193-1199.
- NEDUMPUN, T., TECHAKRIENGKRAI, N., THANAWONGNUWECH, R. & SURADHAT, S. (2019). Negative Immunomodulatory Effects of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Interleukin-1 Receptor Antagonist on Porcine Innate and Adaptive Immune Functions. *Frontiers in Immunology*, 10.
- POMORSKA-MOL, M., MARKOWSKA-DANIEL, I. & BEDNAREK, D. (2010). Flow Cytometric Analysis of Leukocytes in Porcine Mammary Secretions. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54(2), 188-192.
- QUESNEL, H. (2011). Colostrum production by sows: variability of colostrum yield and immunoglobulin G concentrations. *Animal*, 5(10), 1546-1553.
- QUESNEL, H., FARMER, C. & DEVILLERS, N. (2012). Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livestock Science*, 146(2-3), 105-114.
- ROOKE, J. A. & BLAND, I. M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*, 78(1), 13-23.
- RUMBO, M., CHIRDO, F. G., ANON, M. C. & FOSSATI, C. A. (1998). Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clinical and Experimental Immunology*, 112(3), 453-458.
- SALMON, H., BERRI, M., GERDTS, V. & MEURENS, F. (2009). Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(3), 384-393.

- SANGILD, P. T., TRAHAIR, J. F., LOFTAGER, M. K. & FOWDEN, A. L. (1999). Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrum in utero. *Pediatric Research*, 45(4), 595-602.
- SCHNULLE, P. M. & HURLEY, W. L. (2003). Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(3-4), 227-231.
- SINKORA, J., REHAKOVA, Z., SINKORA, M., CUKROWSKA, B., TLASKALOVA-HOGENOVA, H., BIANCHI, A. T. & DE GEUS, B. (1998). Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology*, 95(3), 443-449.
- SINKORA, M. & BUTLER, J. E. (2016). Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 1-17.
- SINKORA, M., SINKORA, J., REHAKOVA, Z. & BUTLER, J. E. (2000). Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *Journal of Immunology*, 165(4), 1832-1839.
- SINKORA, M., SINKOROVA, J., CIMBUREK, Z. & HOLTMEIER, W. (2007). Two groups of porcine TCRgammadelta+ thymocytes behave and diverge differently. *Journal of Immunology*, 178(2), 711-719.
- SINKORA, M., SUN, J., SINKOROVA, J., CHRISTENSON, R. K., FORD, S. P. & BUTLER, J. E. (2003). Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VI. B cell lymphogenesis occurs at multiple sites with differences in the frequency of in-frame rearrangements. *Journal of Immunology*, 170(4), 1781-1788.
- STOTT, G. H., MENEFFEE, B. E., NIGHTENGALE, G. & KLEESE, W. C. (1978). Colostral Immunoglobulin Absorption Related to the Amount of Colostrum Ingested and the Time of Ingestion after Birth in Neonatal Calves. *Journal of Dairy Science*, 61, 164-164.
- SVENDSEN, J., WESTROM, B. R. & OLSSON, A. C. (2005). Intestinal macromolecular transmission in newborn pigs: Implications for management of neonatal pig survival and health. *Livestock Production Science*, 97(2-3), 183-191.
- TUCHSCHERER, M., PUPPE, B., TUCHSCHERER, A. & TIEMANN, U. (2000). Early identification of neonates at risk: Traits of newborn piglets with respect to survival. *Theriogenology*, 54(3), 371-388.
- VALLET, J. L., MILES, J. R. & REMPEL, L. A. (2013). A simple novel measure of passive transfer of maternal immunoglobulin is predictive of preweaning mortality in piglets. *Veterinary Journal*, 195(1), 91-97.
- WILLIAMS, P. P. (1993). Immunomodulating Effects of Intestinal Absorbed Maternal Colostral Leukocytes by Neonatal Pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 57(1), 1-8.
- ZABIELSKI, R., GODLEWSKI, M. M. & GUILLOTEAU, P. (2008). Control of development of gastrointestinal system in neonates. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 1, 35-54.

Supplementary

Table 1. Body weight gains in piglets over the first day of life

	Groups						Pr> χ^2
	GG	GS	GMR	SS	SG	SMR	
Birth weight, kg	1.292±0.048	1.293±0.063	1.287±0.093	1.522±0.091	1.384±0.083	1.380±0.097	0.3820
24 h weight, kg	1.401±0.053	1.311±0.059	1.428±0.142	1.624±0.104	1.411±0.088	1.411±0.091	0.3596
Birth to 24 h weight gain, kg	0.109±0.023	0.018±0.015	0.142±0.114	0.102±0.055	0.027±0.020	0.031±0.019	0.2838

Error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). The analysis was performed with the Kruskal-Wallis tests.

Table 2. Cytokine concentrations (ng/ml) in colostral supernatant from gilt and sow.

Cytokines	Groups		Pr> χ^2
	Gilt	Sow	
GM-CSF	0.006±0.005	0.146±0.071	0.0399
IFN- γ	7.178±5.993	47.05±21.3	0.0207
IL-1 α	0.079±0.029	0.507±0.192	0.0195
IL1 β	0.102±0.052	1.154±0.588	0.0093
IL-1RA	0.588±0.229	4.190±1.929	0.0226
IL-2	0.522±0.210	8.113±6.058	0.0272
IL-4	4.428±2.722	68.47±22.2	0.0225
IL-6	0.102±0.059	4.990±4.161	0.0147
IL-8	19.83±6.51	8.422±3.525	0.1454
IL-10	1.498±0.763	14.29±4.87	0.0076
IL-12	0.318±0.111	2.005±0.825	0.0173
IL-18	2.297±1.005	19.39±8.67	0.0272
TNF- α	0.077±0.027	0.589±0.305	0.0574

Data are shown as Mean \pm SEM

Table 3. Concentration of plasma cytokines and chemokines (ng/mL) from gilt and sow.

Cytokines	Groups		Pr> χ^2
	Gilt	Sow	
GM-CSF	0.118±0.048	4.233±3.797	0.0037
IFN- γ	4.011±2.496	243.93± 108	0.0076
IL-1 α	0.181±0.088	0.708±0.210	0.0543
IL1 β	0.424±0.248	2.020±0.654	0.0911
IL-1RA	1.113±0.565	5.577±1.769	0.0412
IL-2	1.056±0.630	9.900±4.405	0.0247
IL-4	26.69±25.2	120.97±36.1	0.0226
IL-6	0.378±0.333	3.920±1.559	0.0260
IL-8	0.050±0.013	0.252±0.160	0.5645
IL-10	6.716±5.703	28.73±.96	0.0181
IL-12	0.843±0.342	3.170±0.900	0.0500
IL-18	5.261±3.313	37.56±13.5	0.0500
TNF- α	0.084±0.030	3.744±2.373	0.0593

Data are shown as Mean \pm SEM.

Table 4. Total spontaneous proliferation and mitogen-induced lymphocyte proliferation in lymphoid organs.

Organ	Period	Group	Immune Cells					
			T cells (CD3e ⁺)		B cells (CD79a ⁺)		Monocyte/Macrophage	
			NS	Conc A	NS	Conc A	NS	Conc A
Spleen	24 hours	GG	13398±1558 ^{ab}	15463±1341 ^{ab}	5352±1627	7610±1407 ^{ab}	12303±1201 ^b	16538±1447
		GS	11388±875 ^{ab}	11674±830 ^c	4451±1270	6779±1568 ^{ab}	13708±2058 ^{ab}	16646±2293
		GMR	12505±2866 ^{ab}	24252±1995 ^d	5422±1490	9801±1988 ^{ab}	13392±883 ^b	16438±1102
		SS	16331±1324 ^a	18838±1738 ^a	6819±1876	7708±1507 ^{ab}	15886±616 ^a	17265±906
		SG	13026±1374 ^b	14130±1050 ^{ac}	4582±1518	13036±2767 ^a	13261±2472 ^{ab}	17462±1582
		SMR	11425±2448 ^{ab}	12558±2040 ^{bc}	2882±900	5208±832 ^b	14890±1497 ^{ab}	15775±1773
		P - value	0.2707	0.0032	0.5511	0.2077	0.5253	0.9761
	28 days	GG	13531±2773 ^{ab}	21361±2068	6518±789 ^c	19794±2642	13190±435	14883±267 ^a
		GS	9290±1357 ^b	28972±4877	13988±339 ^b	18578±2198	13568±404	15024±872 ^{ab}
		GMR	13361±NA	15352±NA	12400±NA	16727±NA	14094±NA	14052±NA ^a
		SS	19797±2479 ^a	24062±2020	13708±487 ^b	21016±2203	14282±729	15399±1185 ^{ab}
		SG	17252±2929 ^a	24684±2378	15833±1442 ^{ab}	20852±2232	13838±537	14814±588 ^{ab}
		SMR	14214±1227 ^a	24858±831	16387±122 ^a	18841±1729	13610±756	15604±133 ^b
		P - value	0.0701	0.4394	0.0072	0.9123	0.8644	0.5633
Thymus	24 hours	GG	1436±192	2393±374	1077±159 ^{ab}	1504±136 ^{bc}	891.00±206	1294±227 ^a
		GS	2104±279	3464±400	1177±81 ^b	1657±143 ^{ac}	1380±234	2233±201 ^b
		GMR	1766±347	2535±343	965.75±79.1 ^{ab}	1423±143 ^{ab}	1310±178	1551±274 ^{ab}
		SS	1793±134	3142±418	773.60±43.5 ^a	1483±129 ^{ab}	1200±268	1567±277 ^{ab}
		SG	1325±246	3036±493	726.80±129 ^a	1162±27 ^b	1161±81	1556±98 ^a
		SMR	1987±242	3061±268	1288±102 ^b	1899±129 ^c	1533±176	1898±255 ^{ab}
		P - value	0.2412	0.3810	0.0085	0.0122	0.3331	0.1148
	28 days	GG	9107±618 ^b	21230±774	7111± 601 ^a	12622±3164 ^b	1605±299	2448±437
		GS	15688±2138 ^a	19271±3092	7284±1351 ^a	15142±2445 ^{ab}	2754±707	3581±858
		GMR	20122±NA	28724±NA	14815±NA	22639±NA	2155±NA	3360±NA
		SS	18717±1085 ^a	25208±1437	14902±1769 ^b	23268±4057 ^a	3043±797	4123±925
		SG	15583±2453 ^a	20165±2849	10699±1076 ^b	19836±3282 ^{ab}	2951±1003	5396±1118
		SMR	16733±1151 ^a	21025±1322	12623±1538 ^b	16265±1718 ^{ab}	2054±208	2717±580
		P - value	0.0251	0.2892	0.1990	0.2690	0.6565	0.3235
mLN	24 hours	GG	4451±1276 ^b	7615±2299	3428±361	5265±448 ^b	4043±187 ^{ab}	4869±235 ^b
		GS	5865±968 ^b	8136±678	4124±410	5256±335 ^{bc}	3286±231 ^b	3808±313 ^c
		GMR	6610±2280 ^{ab}	7765±2478	5291±398	6342±452 ^{ac}	2097±116 ^c	2505±189 ^c
		SS	10279±1139 ^a	11443±1423	4937±849	8975±1486 ^a	4987±1103 ^{abc}	8125±375 ^a
		SG	6491±214 ^b	7685±367	4372±535	6006±250 ^{ac}	5177±458 ^a	6850±745 ^a
		SMR	5052±688 ^b	7389±1667	3530±675	5644±185 ^{bc}	3007±469 ^{abc}	4051±809 ^{bc}
		P - value	0.0749	0.4416	0.1645	0.0522	0.0052	0.0004
	28 days	GG	8076±1780	9950±1980	10702±1269 ^{ab}	16197±917	5556±476 ^{abc}	6327±318 ^{bd}
		GS	9257±2351	10308±1937	11261±1155 ^{ab}	13782±1502	4265±192 ^b	4930±455 ^c
		GMR	7465±NA	7925±NA	5200±NA	9157±NA	1357±NA	1438±NA
		SS	11594±2656	13361±3352	11338±883 ^a	15027±664	5665±426 ^a	21068±1433 ^a
		SG	8134±1003	9099±1164	6524±842 ^c	12748±271	5222±177 ^a	5641±243 ^{bc}
		SMR	5629±571	8090±744	14010±679 ^b	16554±975	7768±648 ^c	9156±1232 ^d
		P - value	0.4907	0.9029	0.0164	0.0734	0.0094	0.0097

mLN= mesenteric lymph node

NS = nonstimulated

Com A = concanavalin A

Means in the same column with different superscripts differ significantly (p<0.05).

CAPITULO II

Artigo a ser submetido a Revista Veterinary research

A fonte de colostro afeta a maturação intestinal em leitões

**Shaiana S. Maciag¹, Gabrielly Bombassaro², Vanessa Haach³, Marcos A. Z. Morés⁴,
Arlei Coldebella⁴, Franciana V. Bellaver², Ana P. Bastos^{4*}**

¹Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná – Campus CEDETEG, Guarapuava-PR, Brazil

²Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Concórdia-SC, Brazil

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

⁴Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brazil

Resumo

A maturação intestinal do leitão recém-nascido se inicia após o nascimento e está relacionada com a ingestão de colostro, e por apresentar componentes bioativos atua estimulando o crescimento intestinal. No entanto, fêmeas de alta prolificidade geram um número de nascidos superior ao número de tetas e conseqüentemente a ingestão de colostro para cada leitão é prejudicada. Com base nisso, alternativas para evitar a falha na transferência da imunidade passiva são usadas como a criação cruzada e o aleitamento artificial. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a maturação intestinal em leitões alimentados com diferentes fontes de colostro. Foram utilizados 60 leitões de 9 fêmeas, sendo 5 fêmeas multíparas e 4 fêmeas primíparas. Os leitões foram divididos imediatamente após o nascimento em seis grupos tratamentos: grupo PP/LL permaneceram com a mãe biológica seja porca/leitoa; PL/LP separados da mãe e trocado entre a porca e leitoa; PS e LS separados da mãe e alimentados com sucedâneo. Os leitões permaneceram nos grupos experimentais por 24 horas após o nascimento e depois foram devolvidos para as mães. Foi realizado necropsia nos dias 1 e 28 de vida e coletado segmentos do intestino delgado: duodeno, jejuno e íleo, para análise de morfometria. A morfometria intestinal dos leitões apresentaram médias semelhantes entre leitões que ingeriram colostro seja de porca ou de leitoa, porém, os leitões que ingeriram substituto do leite se apresentaram prejudicados em alguns parâmetros, principalmente os leitões nascidos de leitoa e que ingeriram sucedâneo (grupo LS). Demonstrando assim, que o substituto do leite não é recomendado como substituto de colostro, pois ele afeta negativamente a maturação intestinal.

Palavras-chave: absorção intestinal, sucedâneo, suíno, morfometria

Introdução

O desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) do leitão é um processo complexo que se inicia na fase pré-natal e continua após o nascimento, sendo que a dieta é o principal fator que influencia na maturação e função do intestino (Domeneghini, C et al., 2006). A particularidade dos enterócitos fetais é a presença de vacúolos citoplasmáticos com atividade endocítica que permitem o transporte de macromoléculas e compostos bioativos intactos do colostro por meio da barreira intestinal para a circulação sanguínea (Pácha, J et al., 2000), no entanto essa capacidade absorptiva de macromoléculas é cessada nas primeiras 24-36 horas de vida, após esse período os enterócitos vacuolizados são substituídos por enterócitos adultos (Rooke & Bland, 2002).

A ingestão de colostro promove um impulso no crescimento do intestino, através das altas concentrações de fator de crescimento epidérmico (EGF) presentes no colostro e no leite atuam no crescimento intestinal, dobrando de peso e aumenta seu comprimento em 30% nos primeiros 3 dias de vida (Xu et al., 1992). O comprimento e a largura das vilosidades, a profundidade da cripta e a espessura da mucosa do intestino delgado aumentam do dia 0 ao dia 3, e diminui do dia 3 ao dia 14 após o nascimento (Skrzypek et al., 2005). A maturação intestinal está associada a remodelação das células epiteliais, através da modificação das funções dos enterócitos que levam à proliferação por mitose gerando novas células (Zabielki, et al., 2005).

Leitões alimentados com substituto do leite apresentavam altura de vilosidade e profundidade de cripta semelhantes a leitões alimentados com colostro, no entanto o sucedâneo é ineficiente no transporte de macromoléculas via epitélio intestinal, e ainda, o fechamento intestinal ocorre mais cedo entre 10 e 12 horas após o nascimento (Jensen et al., 2001).

A seleção genética baseada na hiperprolificidade de fêmeas suínas aumentou o número de leitões nascidos, porém a capacidade da fêmea em criar leitegadas grandes, com mais de 14 nascidos, é limitada (Pieper et al., 2016), com base nisso há uma crescente necessidade de buscar alternativas para favorecer a ingestão adequada e suficiente de colostro nas primeiras horas de vida, seja ela por meio de mães adotivas ou por substitutos do leite. No entanto, pouco se sabe sobre se essas práticas afetam a maturação intestinal do leitão. Com base nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a maturação intestinal através da morfometria e contagem de células caliciformes do intestino delgado de leitões alimentados com diferentes fontes de colostro.

Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa Suínos e Aves (protocolo nº 001/2016). O experimento foi conduzido em nove matrizes suínas 5 fêmeas múltiparas (OP >4) e 4 fêmeas primíparas mestiças Landrace X Large White (LR3LW) e seus leitões. Durante a gestação, as porcas foram alojadas individualmente em piso ripado. Uma semana antes da data prevista para o parto, as fêmeas foram transferidas para a sala de parto. As porcas tinham livre acesso à água e eram alimentadas duas vezes por dia com uma dieta tradicional de gestação. A dieta alimentar foi fornecida até o segundo dia de lactação.

Parto e Grupos Experimentais

O processo de parto foi induzido pela injeção de um análogo da prostaglandina F2a (Fabiani Saúde Animal – São Paulo – Brasil) aos 113 dias de gestação, por via

intramuscular. A partir do nascimento, antes da primeira mamada, os leitões foram divididos em 6 grupos experimentais:

Grupo LL= Leitões nascidos das leitoas e que permaneceram com a mãe ($n=10$)

Grupo LP= Leitões nascidos das marrãs foram trocados e mamaram o colostro da porca normalmente ($n=10$)

Grupo LS= Leitões foram isolados das marrãs e alocados em um escamoteador e alimentados com substituto lácteo para leitões a cada 1 hora durante 24 horas ($n=6$)

Grupo PP= Leitões nascidos das porcas e que permaneceram com a mãe ($n=10$)

Grupo PL= Leitões nascidos das porcas foram trocados e mamaram o colostro de marrãs normalmente ($n=10$)

Grupo PS= Leitões nascidos das porcas isolados em um escamoteador e alimentados com substituto lácteo para leitões a cada 1 hora durante 24 horas ($n=8$).

Os leitões permaneceram nos grupos durante 24 horas e após esse período todos leitões foram devolvidos para suas devidas mães.

Os leitões foram pesados ao nascimento, com 24 horas e 28 dias de vida

Necropsia e Coleta de Amostras

Foram selecionados 5 animais de cada grupo para eutanásia com 1 e 28 dias de idade. Foi realizada sedação e analgesia com zoletil 1ml/kg (Virbac®) seguido de sangria para os leitões com 1 dia de vida, já para os leitões com 28 dias de vida foi utilizado o método de eletronarcolese seguido de sangria. Na necropsia foram coletados uma porção de 5cm do duodeno, jejuno e íleo, os segmentos foram lavados com solução salina 0,9% e

fixado em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram incluídos em parafina, e cortados em fatias de 1cm em micrótomo. Os cortes foram montados em lâminas de microscopia e corados com Hematoxilina e eosina, para análise morfométrica dos seguintes parâmetros: altura de vilosidade, profundidade da cripta, relação vilo:cripta, espessura de vilosidade, espessura de mucosa. Para a contagem de células caliciformes foi realizada a coloração com Alcian Blue e PAS e foram contabilizadas 10 medidas de cada parâmetro, bem contadas a células caliciformes presentes em 10 vilosidades de cada segmento intestinal. Em seguida foram analisadas em microscópio e as medidas foram realizadas no programa Axion Vision 4.8 (ZEISS®).

Resultados

O peso médio dos leitões foi 1,40 kg e não houve diferenças de peso entre os grupos. Foi evidenciado diarreia entre os leitões dos grupos alimentados com sucedâneo (PS e LS) nas primeiras 20 horas de vida. O índice de mortalidade dos grupos que receberam sucedâneo (LS e PS) foi de 66%, esses animais vieram a óbito na primeira semana de vida e os dados desses animais foram excluídos do experimento.

Os resultados da morfometria intestinal dos grupos experimentais estão relatados na tabela 1. Com base nos resultados, observamos que o segmento do duodeno às 24 horas de vida do grupo que nasceu da leitoa e foi alimentado com sucedâneo (LS) apresentou vilosidades mais curtas em relação aos grupos que ingeriram colostro, seja de leitoa ou de porca (Tabela 1). Entretanto, os leitões que nasceram da porca e foram alimentados com sucedâneo (PS) apresentaram tamanho de vilosidade semelhante aos grupos que nasceram da leitoa (LL e LP). O grupo PP e PL apresentaram alturas de vilosidade semelhantes e maiores quando comparados aos outros grupos. A profundidade da cripta foi maior nos grupos que nasceram da porca, independentemente do tipo de colostro ingerido, contudo destaca-se que o grupo PP apresentou maior profundidade de cripta em

comparação aos demais grupos. A profundidade da cripta foi semelhante entre os leitões nascidos da leitoa (LL, LS e LP), não havendo influência da fonte de colostro. A relação vilo/cripta (V/C) (gráfico 1) foi maior no grupo LP e não houve diferenças entre os grupos PP, PL, LS e PS, no entanto o grupo LL apresentou menor relação V/C. A espessura do vilo foi maior no grupo que permaneceu com a porca (PP), e semelhante entre os grupos PL, PS, LL e LP, com exceção do grupo LS que apresentou a menor espessura de vilosidade. A espessura da mucosa foi maior e igual entre os grupos nascidos da porca (PP, PL e PS) bem como no grupo que permaneceu com a leitoa (LL) e apresentou as menores médias nos grupos LP e LS.

No jejuno, a altura da vilosidade foi maior nos leitões que nasceram das porcas (PL, PP e PS), destacando que o grupo que permaneceu com a mãe (PP) foi significativamente maior do que os outros grupos (Tabela 1). Os leitões nascidos da leitoa (LL, LP, LS) apresentaram médias menores do que os grupos nascidos da porca, destacando que o grupo que permaneceu com a leitoa (LL) foi maior do que o grupo que ingeriu colostro de porca ou sucedâneo (LP e LS).

A profundidade da cripta foi maior nos grupos de leitões que nasceram das porcas do que os leitões que nasceram das leitoas, destacando que os grupos PP e PL foram significativamente maiores em relação aos demais grupos. Curiosamente o grupo PS e LL foram semelhantes entre si e maiores que os grupos LP e LS.

A relação V/C foi maior no grupo PP quando comparado aos demais grupos, e foi semelhante entre os grupos PS e LS, destacando que os grupos LL, PL e LP foram semelhantes entre si e inferiores aos grupos PP, PS e LS.

A espessura do vilo foi maiores nos grupos PP e PL, e semelhantes entre os grupos PS, LP, LL e LS, destacando que o grupo LS apresentou a menor média. O mesmo se observa

na espessura da mucosa, com exceção dos grupos PS, LP e LS que são semelhantes entre si e maiores do que o grupo LP.

No íleo observamos as alturas das vilosidades e a profundidade das criptas foram maiores no grupo que permaneceu com a porca (PP) e semelhantes entre os grupos (LL, PL, PS), sendo menores no grupo LP e LS (Tabela 1). Não houve diferenças significativas entre a relação V/C entre os grupos. A espessura do vilão foi significativamente maior no grupo PP, e semelhante entre os grupos PL, PS e LL. Apresentando menores médias nos grupos LP e LS. Com relação a espessura da mucosa, os grupos que nasceram da porca foram superiores aos demais grupos, destacando que o grupo que permaneceu com a mãe (PP) foi ainda superior. Os grupos LL e LP foram semelhantes entre si e menores do que os grupos PL e PS.

Tabela 1. Análise morfométrica do intestino delgado de leitões com 24 horas de vida

Variáveis	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	LL	LP	LS	PP	PL	
Duodeno						
AV, μm	474,4 \pm 158,4	459,4 \pm 92,3	307,5 \pm 93	599 \pm 177,3	547,8 \pm 161,3	448,4 \pm 110,5
PC, μm	87,4 \pm 20,02	94,1 \pm 16,25	79,9 \pm 11,8	134,8 \pm 29,7	106,4 \pm 33,1	106 \pm 20,9
V/C	3,9 \pm 2,05	5,3 \pm 1,1	4 \pm 1,2	4,6 \pm 13,9	4,5 \pm 1,6	4,6 \pm 1,3
EV, μm	122,28 \pm 28,1	85 \pm 13,8	79,9 \pm 15,3	126,2 \pm 29,1	116,4 \pm 16,3	120,4 \pm 18,2
EM, μm	171,46 \pm 37,7	152,8 \pm 21,5	140 \pm 30,6	216,7 \pm 47,7	177,9 \pm 34	174,6 \pm 29,4
Jejuno						
AV, μm	538,4 \pm 202,1	488 \pm 142,3	461,6 \pm 107,1	895 \pm 208,3	734 \pm 205	646,3 \pm 189,4
PC, μm	103,5 \pm 20	85,9 \pm 14,8	76,5 \pm 18,7	131,1 \pm 35,7	162,6 \pm 33,1	90,1 \pm 22,2
V/C	5,7 \pm 2	5,8 \pm 2	6,4 \pm 2,1	7,2 \pm 2,6	5,3 \pm 1,8	6,8 \pm 2,1
EV, μm	107,5 \pm 29,4	93 \pm 16,4	107,8 \pm 23,8	132,6 \pm 37,3	138,7 \pm 32,2	112,2 \pm 25,9
EM, μm	163,3 \pm 28,8	141,8 \pm 22,2	128,6 \pm 27,3	253,5 \pm 65	288,9 \pm 71,3	154 \pm 41,6
Íleo						
AV, μm	548,9 \pm 145,3	455,2 \pm 109,9	353,6 \pm 79,2	697,9 \pm 83	545,9 \pm 163,8	560 \pm 191,9

PC, μm	111,2 \pm 19,5	82,8 \pm 14,7	74,4 \pm 14	151,3 \pm 31,2	116,8 \pm 22,7	101,8 \pm 24,3
V/C	5 \pm 1,1	5,6 \pm 1,7	4,8 \pm 1,4	4,8 \pm 1,7	4,9 \pm 1,5	5,6 \pm 2,2
EV, μm	108 \pm 20,86	102,8 \pm 21,3	88,8 \pm 20,4	154,7 \pm 40,7	128,1 \pm 27	127,8 \pm 30,2
EM, μm	182,5 \pm 43,4	129,4 \pm 26,4	117,5 \pm 21	254,2 \pm 51,9	190,7 \pm 38,8	170,5 \pm 41,8

A morfometria dos intestinos aos 28 dias de idade está demonstrada na tabela 2. Podemos observar que aos 28 dias de idade ocorreu uma diminuição na altura da vilosidade do intestino delgado de todos os grupos, com exceção dos grupos LS e LL em que houve um aumento deste parâmetro no duodeno, também observamos que os leitões que permaneceram com a mãe (PP e LL) apresentaram uma maior altura de vilosidade que os outros grupos, seguido dos grupos PL e LP e por fim os leitões que foram alimentados com sucedâneo ainda se apresentavam com as menores médias no duodeno e no íleo.

De forma geral, nos três segmentos do intestino delgado, ocorreu um aumento nos demais parâmetros avaliados, com exceção da relação V/C que diminuiu em todos os grupos, representado na figura 1.

Houve um aumento considerável da espessura da mucosa e vilosidade nos grupos LL e LS quando comparados às 24 horas de vida. A espessura do vilo aumentou igualmente em todos os grupos, sendo que o grupo LL apresentou a maior média, enquanto que os demais grupos foram semelhantes entre si.

Tabela 2. Análise morfométrica do intestino delgado de leitões com 28 dias de vida

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Variáveis	LL	LP	LS	PP	PL	PS
Duodeno						
AV, μm	493,7 \pm 80,9	436,6 \pm 28,2	356,4 \pm NA	479,7 \pm 102,4	413 \pm 87,5	369,6 \pm 39,4
PC, μm	180,2 \pm 34,2	165,8 \pm 33,4	217,6 \pm NA	173,2 \pm 32,7	184,6 \pm 42,7	159,5 \pm 27,8

EV, μm	230,4 \pm 70	128,8 \pm 32,4	133,8 \pm NA	176 \pm 40,3	132 \pm 30,1	169,5 \pm 70,4
EM, μm	325,2 \pm 48,7	272,6 \pm 50,8	377,6 \pm NA	256,6 \pm 40,6	247,8 \pm 50,7	230,5 \pm 38,2
Jejuno						
AV, μm	600,3 \pm 93,7	379,7 \pm 58,6	354,8 \pm NA	495,1 \pm 82,6	343,7 \pm 67,7	370,6 \pm 92,9
PC, μm	159,9 \pm 24,9	135,2 \pm 26,9	156,8 \pm NA	131,6 \pm 21,7	120,2 \pm 30,3	115,2 \pm 33,3
EV, μm	160,7 \pm 28,5	128 \pm 32,7	116,7 \pm NA	151 \pm 31,4	116,8 \pm 34,2	124,8 \pm 41,9
EM, μm	245,4 \pm 45	203,2 \pm 35,6	206,9 \pm NA	212,2 \pm 37,5	200,9 \pm 67,9	186,8 \pm 60,2
Íleo						
AV, μm	418,1 \pm 110	318,9 \pm 80,8	321,2 \pm NA	406,8 \pm 110,9	367,4 \pm 72,4	265 \pm 73,4
PC, μm	154,2 \pm 39,2	121,6 \pm 30,6	140,9 \pm NA	109,8 \pm 27,5	138,8 \pm 33,9	96,6 \pm 27,5
EV, μm	187,8 \pm 56,9	120,5 \pm 42,5	173,6 \pm NA	169,4 \pm 46,8	127,8 \pm 36,1	137,5 \pm 46,8
EM, μm	260,7 \pm 63,3	188,7 \pm 45	193,9 \pm NA	202 \pm 41,7	203 \pm 45,1	175,3 \pm 46,5

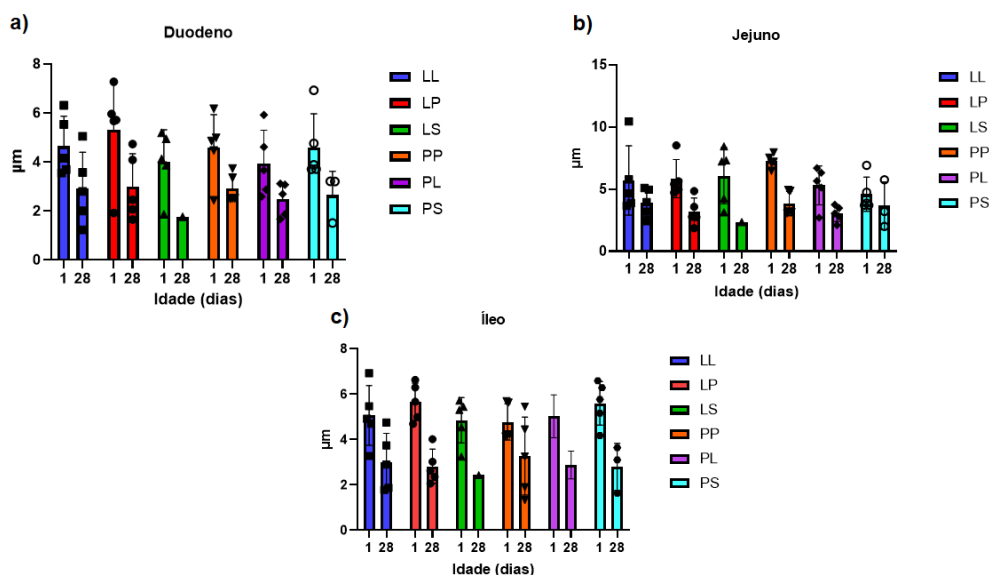


Figura 1. Cálculo da relação vilos:cripta do duodeno (a), jejuno (b) e íleo (c) dos grupos com 1 e 28 dias de idade.

Conforme a tabela 3, podemos observar que as células caliciformes às 24 horas de vida, no duodeno foram significativamente maiores no grupo alimentado com sucedâneo (PS), e semelhantes entre os grupos PL, PP, LP e LS, sendo que a menor média apresentada pelo grupo LL. Aos 28 dias de idade houve um aumento no número de células

igualmente em todos os grupos, destacando que o grupo PS ainda permaneceu com mais contagem em relação aos demais grupos.

No segmento jejunal, às 24 horas de vida, as células caliciformes foram maiores e iguais entre os grupos PS, LS e PL, e se apresentou menor e igual entre os grupos LL, LP e PP.

As células caliciformes do íleo foram semelhantes entre os grupos, com exceção do grupo PS que apresentou menor média. Com relação aos 28 dias de idade houve um aumento em todos os grupos, destacando que os grupos LP e PS apresentaram um aumento considerável em relação ao primeiro dia de vida e aos demais grupos.

Ocorreu um aumento considerável nas células caliciformes do íleo (tabela 3) destacando que o grupo PL apresentou um aumento significativo em relação ao primeiro dia de vida e aos demais grupos. Os grupos LS e LL foram semelhantes entre si e superiores aos grupos PP, PS e LP.

Tabela 3. Células caliciformes do duodeno, jejuno e íleo de leitões com 1 e 28 dias de vida

	Grupos Experimentais					
	LL	LP	LS	PP	PL	PS
	Duodeno					
1d	7,8±2,4	9,5±2,6	9,2±2,4	9,2±3,1	8,6±2,6	12±3,6
28d	10,3±3,3	13,2±3,9	11,3±NA	11,8±3,3	11,7±3,3	14,8±4
	Jejuno					
1d	6,8±1,7	7,1±1,7	10,1±3,3	6,4±2,3	9,5±2,5	8,9±3,7
28d	9,2±2,6	23,6±3,7	22,7±NA	9,6±2,4	10,6±3	15,2±4,5
	Íleo					
1d	13,2±3,8	11,8±3,4	13,3±4,4	12,3±3,8	13,6±4,4	8,9±3,6
28d	21,8±6,2	18,5±6,4	23,9±NA	17±5,8	58,9±4,8	18,3±5,7

Discussão

Sabe-se que após o nascimento, o intestino do neonato passa por uma intensa fase de mitose das células, esse fenômeno ocorre em consequência da adesão e absorção das proteínas do colostro, fazendo com que aumente a área absorptiva das vilosidades (Barszcz & Skomial, 2011). Bem como as vilosidades aumentam seu tamanho pelo maior aporte sanguíneo distribuído na mucosa intestinal no período pós natal (Zabielski et al., 2008). Podemos observar que o estado nutricional influencia muito o crescimento e função intestinal, visto que em nosso estudo observamos que os animais alimentados com substituto do leite tiveram a maturação intestinal afetada negativamente, destacando que o grupo LS apresentou valores inferiores nos parâmetros de altura de vilosidade do duodeno e jejuno no primeiro dia de vida. Resultado não surpreendente porque é de conhecimento que os componentes do colostro, como os fatores de crescimento atuam na mucosa estimulando a proliferação celular e favorecem o crescimento morfológico do intestino (Xu et al., 2000). No entanto, o grupo que nasceu da porca e foi alimentado com sucedâneo (PS) apresentou resultado semelhantes aos grupos que nascidos da leitoa e que ingeriram colostro de leitoa ou de porca, corroborando com outro estudo semelhante que também não encontrou diferenças significativas entre os parâmetros intestinais de altura de vilosidade e profundidade da cripta em leitões alimentados com substituto do leite e colostro suíno no primeiro dia de vida (Jensen et al., 2001).

Uma vilosidade mais alta garante maior contagem de enterócitos, o que aumenta a superfície de absorção resultando em maior produção de enzimas, aumento da área absorptiva e melhor sistema de transporte de nutrientes pelo epitélio intestinal (Awad et al., 2009). Sabe-se que o encurtamento da vilosidade prejudica a capacidade digestiva do intestino delgado, induzindo à má absorção e diarreia (Marion et al., 2002) como observado em nosso estudo, todos os leitões que receberam o sucedâneo, apresentaram diarreia nos cinco primeiros dias de vida (grupos LS e PS), corroborando com estudos

anteriores que utilizaram o substituto do leite em leitões aos 23 dias de idade e que também resultaram em diarreia (Poulsen et al., 2017), que pode ser explicado pelo fato de que leitões alimentados com substituto do leite apresentam maior colonização de *Escherichia coli* no intestino (Sugiharto et al., 2015)

De modo geral, pode se observar que os leitões nascidos de fêmeas multíparas apresentavam altura de vilosidade, espessura da vilosidade e espessura da mucosa maiores que os leitões nascidos de fêmeas primíparas, entretanto os leitões que foram alimentados com sucedâneo apresentaram parâmetros de altura de vilosidade inferiores, demonstrando assim que o desenvolvimento intestinal do leitão neonato é fortemente afetado pela ingestão de colostro, e que não há diferenças entre a maturação intestinal do duodeno de um leitão que ingeriu colostro de porca com o que ingeriu colostro de leitoa.

A relação vilosidade/cripta é um parâmetro importante a ser considerado, visto que o desejável é que as vilosidades apresentem altas enquanto que as criptas reduzidas, sendo assim quanto maior for a relação V:C melhor vai ser a absorção intestinal como visto em nosso estudo, os 3 segmentos intestinais apresentaram relação vilo:cripta semelhantes a um estudo recente (Yin et al., 2022) também com 24 horas de vida. No entanto, os leitões que ingeriram sucedâneo do grupo LS apresentaram a relação vilosidade:cripta do duodeno, jejuno e íleo diminuída, nos 28 dias após o nascimento quando comparada aos grupos que ingeriram colostro, demonstrando que a absorção intestinal foi influenciada pela ingestão de sucedâneo no primeiro dia de vida. O grupo nascido da leitoa e alimentado com sucedâneo (LS) foi mais afetado pela dieta, pois apresentou parâmetros morfométricos baixos, principalmente no duodeno e íleo, no dia 1 e permaneceram inferiores aos 28 dias de idade também.

Leitões suplementados artificialmente com substituto do leite desde os primeiros dias de vida apresentam maior ganho de peso até o desmame, no entanto tal prática não

diminuiu a mortalidade em ninhadas de 10 a 12 leitões (Azain et al., 1996; Wolter et al., 2002), tendo em vista esse fato, a substituição totalmente do colostro por sucedâneo não foi uma alternativa bem sucedida, considerando que os leitões alimentados dessa forma apresentaram diarreias e altas taxas de mortalidade, isso se deve principalmente pelo fato de que não adquiriram imunidade materna transferida pela ingestão de colostro nas primeiras horas de vida. Outro estudo semelhante em que os leitões foram isolados das mães com 3 dias de idade e alimentados *ad libitum* com substituto do leite levou a atrofia da vilosidade após dois dias de ingestão de sucedâneo e a profundidade da cripta foi maior aos 19 dias, quando comparado aos leitões que permaneceram com a porca (Vergauwen et al., 2017). No entanto, a suplementação com sucedâneo a partir dos 5 dias de idade influenciou positivamente, aumentando a sobrevivência dos leitões em ninhadas supranuméricas (C. Kobek-Kjeldager et al., 2020).

Os leitões que permaneceram com a porca (PP) foram melhores em relação aos demais grupos, isso se deve, pelo fato de que colostro de fêmeas múltíparas é superior em componentes imunológicos quando comparados com o colostro de fêmeas primíparas (Forner et al., 2021), outra justificativa sugestiva é pelo fato de que esses leitões não sofreram o estresse da troca de mãe, bem como também receberam a imunidade celular materna que é transferida do colostro somente para leitões biológicos (Bandrick et al., 2014).

Os resultados morfométricos no duodeno e jejuno observados nos leitões do grupo PP aos 28 dias corroboram com resultados observados em leitões de 35 dias de idade que também foram alimentados com colostro de porca (Xing et al., 2017). A altura da vilosidade e a profundidade da cripta, bem como a relação vilo:cripta do duodeno de leitões que ingeriram colostro de porca foram semelhantes a outro trabalho também com 28 dias de idade (Rigueira et al., 2013). Entretanto, os leitões dos grupos PL e LP também

apresentaram resultados próximos e em alguns parâmetros melhores que o grupo PP; sugerindo que os leitões que nascem de leitoas podem melhorar o seu desempenho imunológico e maturação intestinal com a ingestão de colostro de porcas múltiparas.

Nas criptas intestinais estão localizadas as células tronco que são responsáveis pela proliferação de células epiteliais, bem como atuam na diferenciação de enterócitos favorecendo assim o crescimento das vilosidades e ajudam a manter a integridade do epitélio intestinal protegendo contra possíveis agressões causadas pela passagem do alimento e também são fundamentais em respostas imunes locais e sistêmicas (Moossavi. Et., 2013). Em nosso estudo observamos que a profundidade da cripta aumentou aos 28 dias, como esperado, pois é o local de proliferação de células tronco e se intensifica com o crescimento do leitão, também observado por Yuan et al., (2021)

Como visto em nosso estudo e também já evidenciado, nenhum sistema de aleitamento artificial utilizando fórmulas de substitutos do leite podem reproduzir as funções e características no organismo do suíno que o colostro materno fornece (Zabielski et al., 2008)

O número de células caliciformes foi maior, principalmente no duodeno dos leitões do grupo alimentado com sucedâneo (PS) no primeiro dia de vida e permaneceu alto ainda aos 28 dias de idade. As células caliciformes nas vilosidades e também nas criptas intestinais, participam da manutenção e desenvolvimento do epitélio da mucosa intestinal, como também são o primeiro mecanismo de defesa inato, secretando muco e protegendo a mucosa da penetração de agentes patogênicos (Ren et al., 2012; Smirnov et al., 2004); mas esse aumento na proliferação celular tão precocemente pode vir a reduzir a idade e maturidade das células caliciformes, o que pode afetar o tipo de mucina, produzida por estas células (Yaghobfar et al., 2007), como também modificar a dinâmica

da mucina e influenciar as suas funções e a sanidade do trato digestivo (Smirnov et al., 2004).

No entanto, deve avaliar o substituto do leite como um todo, não somente pela maturação intestinal mas principalmente pela transferência de imunidade. Com base nesses estudos, sugere-se que o substituto do leite pode ser fornecido como um suplemento ao leite da porca, mas não substituir totalmente, bem como sua introdução na dieta dos animais deve ser após 3 dias de idade.

Conclusão

Como observado em nosso estudo, o sucedâneo afetou negativamente a maturação intestinal principalmente pela ocorrência de diarreia e aumento da mortalidade. Nosso estudo contribui para estudos futuros do uso do sucedâneo como suplementação da dieta dos leitões e iniciar seu fornecimento a partir dos 3-4 dias de vida. E que o mesmo não deve ser fornecido no primeiro dia de vida pois afeta negativamente a maturação intestinal e aumenta o índice de mortalidade. A criação cruzada ainda é prática mais aceitável, permitindo que leitões excedentes de uma fêmea tenham um bom desenvolvimento e ganho de peso, no entanto essa troca de mães deve ser feita após as primeiras 12 horas de vida do leitão, permitindo que o colostro ingerido seja da própria mãe. Outras alternativas devem ser adotadas como a mamada parcelada, dessa forma garantindo que o leitão ingira colostro suficiente nas primeiras horas de vida.

REFERÊNCIAS

- AWAD W.A, GHAREEB K, ABDEL-RAHEEM S, BÖHM J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88 (1), 49–55.
- AZAIN M.J, TOMKINS T, SOWINSKI J.S, ARENTSON R.A, JEWELL D.E. (1996). Effect of Supplemental Pig Milk Replacer on Litter Performance : Seasonal Variation in Response. *Journal of Animal Science*, 74 (9), 2195–202
- BANDRICK, M., ARIZA-NIETO, C., BAIDOO, S. K. & MOLITOR, T. W. (2014). Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(1), 114-120.
- BARSZCZ, M. & SKOMIAL, J. (2011). The development of the small intestine of piglets chosen aspects. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20(1), 3-15.
- RIGUEIRA M. C. L, THOMAZ MC, RIGUEIRA M. C. D, PASCOAL F. A. L, AMORIM B. A, BUDINO L. E.F. (2013). Effect of plasma and / or yeast extract on performance and intestinal morphology of piglets from 7 to 63 days of age. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Cd, 496–503.
- DOMENEGHINI C, DI GIANCAMILLO A, ARRIGHI S, BOSI G. (2006). Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. State of the art in the pig, and perspectives towards humans. *Histology and Histopathology*, 21 (1-3) 273–83.
- FORNER, R., BOMBASSARO, G., BELLAVER, F. V., MACIAG, S., FONSECA, F. N., GAVA, D., LOPES, L., MARQUES, M. G. & BASTOS, A. P. (2021). Distribution difference of colostrum-derived B and T cells subsets in gilts and sows. *Plos One*, 16(5).
- JENSEN, A. R., ELNIF, J., BURRIN, D. G. & SANGILD, P. T. (2001). Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. *Journal of Nutrition*, 131(12), 3259-3265.
- KOBEK-KJELDAGER C, MOUSTSEN VA, THEIL PK, PEDERSEN LJ. (2020). Effect of litter size, milk replacer and housing on production results of hyper-prolific sows. *Animal* 14(4), 824–33.
- MARION J, BIERNAT M, THOMAS F, SAVARY G, LE BRETON Y, ZABIELSKI R, LURON H. I, DIVIDICH J. (2002). Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reproduction Nutrition Development* (42), 339–354.
- MOOSSAVI S, ZHANG H, SUN J, REZAEI N. (2013). Host-microbiota interaction and intestinal stem cells in chronic inflammation and colorectal cancer. *Expert Review of Clinical Immunology*. 9(5):409–422.
- PÁCHA J. Development of intestinal transport function in mammals. (2000). *Physiological Reviews*. 80(4), 1633–1667.
- PIEPER R, SCHAREK-TEDIN L, ZETZSCHE A, RÖHE I, KRÖGER S, VAHJEN W, ZENTEK J. (2016). Bovine milk-based formula leads to early maturation-like morphological, immunological, and functional changes in the jejunum of neonatal piglets *Journal of Animal Science*. 94(3), 989–999.
- POULSEN, A. S. R., DE JONGE, N., SUGIHARTO, S., NIELSEN, J. L., LAURIDSEN, C. & CANIBE, N. (2017). The microbial community of the gut differs between piglets fed sow milk, milk replacer or bovine colostrum. *British Journal of Nutrition*, 117(7), 964-978.
- REN J, YAN X, AI H, ZHANG Z, HUANG X, OUYANG J, YANG. M. YANG H, HAN P ZENG W, CHEM Y, GUO Y, XIAO S, DING N, HUANG L (2012). Susceptibility towards Enterotoxigenic Escherichia coli F4ac Diarrhea Is Governed by the MUC13 Gene in Pigs. *PLoS One*. 7(9), 1–11.

- ROOKE, J. A. & BLAND, I. M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*, 78(1), 13-23.
- SKRZYPEK, T., VALVERDE PIEDRA, J. L., SKRZYPEK, H., WOLINSKI, J., KAZIMIERCZAK, W., SZYMANCZYK, S., PAWLOWSKA, M. & ZABIELSKI, R. (2005). Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. *J Physiol Pharmacol*, 56 Suppl 3, 71-87.
- SMIRNOV A, SKLAN D, UNI Z. (2004). Mucin Dynamics in the Chick Small Intestine Are Altered by Starvation. *Journal of Nutrition*. 134(4) 736–742.
- SUGIHARTO S, POULSEN ASR, CANIBE N, LAURIDSEN C. (2015). Effect of bovine colostrum feeding in comparison with milk replacer and natural feeding on the immune responses and colonisation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the intestinal tissue of piglets. *British Journal of Nutrition*. 113(6), 923–34.
- VERGAUWEN H, DEGROOTE J, PRIMIS S, WANG W, FRANSEN E, DE SMET S, CASTELEYN C, CRUCHTEN S, MICHIELS J, GINNEKEN C. (2017). Artificial rearing influences the morphology, permeability and redox state of the gastrointestinal tract of low and normal birth weight piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8(1),1–14.
- WOLTER BF, ELLIS M, CORRIGAN BP, DEDECKER JM. (2002). The effect of birth weight and feeding of supplemental milk replacer to piglets during lactation on preweaning and postweaning growth performance and carcass characteristics. *Journal Animal Science*. 80(2),301–8.
- XING S, ZHANG BL, LIN M, LI JL, ZHANG L, GAO F, ZHOU E. (2017). Effects of alanyl-glutamine supplementation on the small intestinal mucosa barrier in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. *Canadian Journal of Animal Science*. 98(1), 144–55.
- XU RJ, WANG F, ZHANG SH. (2000). Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: A possible role of milk-borne growth factors. *Livestock Production Science*. 66(2), 95–107.
- XU, R. J., TUNGTHANATHANICH, P., BIRTLES, M. J., MELLOR, D. J., REYNOLDS, G. W. & SIMPSON, H. V. (1992). Growth and morphological changes in the stomach of newborn pigs during the first three days after birth. *Journal of Developmental Physiology*, 17(1), 7-14.
- YAGHOBFAR, A., BOLDAJI, F. & SHRIFI, S. D. (2007). Effects of enzyme supplement on nutrient digestibility, metabolizable energy, egg production, egg quality and intestinal morphology of the broiler chicks and layer hens fed hull-less barley based diets. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(14), 2257-2266.
- YIN L, LI J, ZHANG Y, YANG Q, YANG C, YI Z, YIN Y, WANG O, LI J, DING N, ZHANG Z, YANG H, YIN Y, (2022). Changes in progenitors and differentiated epithelial cells of neonatal piglets. *Animal Nutrition*. 8(1), 265–76.
- YUAN C, ZHANG P, JIN Y, SHAH AU, ZHANG E, YANG Q. (2021). Single-blinded study highlighting the differences between the small intestines of neonatal and weaned piglets. *Animals*. 11(2), 1–14.
- ZABIELSKI R, GODLEWSKI MM, GUILLOTEAU P. (2008). Control of development of gastrointestinal system in neonates. *Journal Physiology and Pharmacology*. 59(1), 35–54.
- ZABIELSKI R, LAUBITZ D, WOLIŃSKI J, GUILLOTEAU P. (2005). Nutritional and hormonal control of gut epithelium remodeling in neonatal piglets. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 14(1), 99–112.