



KARINA TOLEDO DA SILVA

**EFFECT OF LIVE YEAST PRODUCTS ON
PERFORMANCE, DIGESTION,
THERMOREGULATION, AND IMMUNE RESPONSE
OF LACTATING COWS DURING SUMMER**

**LAVRAS – MG
2018**

KARINA TOLEDO DA SILVA

**EFFECT OF LIVE YEAST PRODUCTS ON
PERFORMANCE, DIGESTION,
THERMOREGULATION, AND IMMUNE RESPONSE
OF LACTATING COWS DURING SUMMER**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Coorientadoras

Prof. (a) Dra. Ana Paula Peconick

Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

**LAVRAS – MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Karina Toledo da.

Effect of live yeast products on performance, digestion, thermoregulation, and immune response of lactating cows during summer : Effect of live yeast products on performance, digestion, thermoregulation, and immune response of lactating cows during summer / Karina Toledo da Silva. - 2018.

90 p.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick, Renata Apocalypse Nogueira Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Vacas em lactação. 2. Leveduras. 3. Imunidade. I. Pereira, Marcos Neves. II. Peconick, Ana Paula. III. Pereira, Renata

KARINA TOLEDO DA SILVA

**EFFECT OF LIVE YEAST PRODUCTS ON PERFORMANCE,
DIGESTION, THERMOREGULATION, AND IMMUNE RESPONSE OF
LACTATING COWS DURING SUMMER**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2018.

Dra. Ana Paula Peconick

UFLA

Dra. Renata A. N. Pereira

EPAMIG

Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha

UFLA

Dr. Gustavo Augusto de Andrade

IFSM

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

*Aos meus pais, Francisco e Ivete, meus irmãos, Karen, Ricardo, Arthur e Andressa e
meu esposo Clério...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo sempre.

À minha família pelo apoio em todas as horas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida, à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pela liberação para realização do Doutorado, à Universidade Federal de Lavras e aos departamentos de Ciências Veterinárias e Zootecnia pela oportunidade e aprendizado.

Ao professor Marcos por sua grande contribuição para minha vida profissional, pela sua paciência, pela oportunidade e por todo o conhecimento.

À professora Ana Paula pelo grande conhecimento, atenção, paciência, carinho e apoio durante o doutorado.

Ao Lucas pelo apoio e análises de citocinas.

Ao professor Lacrete pelas análises de ultrassom.

Ao Instituto Pasteur, em especial à Dra. Karin Scheffer pela realização das titulações de anticorpos.

À professora Carla pela contribuição, apoio e colaboração nos trabalhos.

À Renata pelo apoio e ajuda ao longo desses anos.

Ao Grupo do Leite e aos bolsistas por todas as coletas, trabalhos diários, apoio e companheirismo em todos esses anos.

Aos amigos de pós-graduação e companheiros de estudo Tchotchola, Peixoto, Rafael, Fernanda e Otília pelas muitas horas de estudo e apoio.

Aos amigos da pós-graduação Douglas, Izabella, Julia, Naina, Letícia, Lucas e Rayana.

À amiga Tati pelo apoio nas análises, pelas horas de estudo, pela amizade, carinho e pela disposição em sempre ajudar.

Aos amigos Eugenio e Peixoto pela colaboração valorosa nas análises estatísticas.

Aos amigos e “cuidadores” durante a fase do pé quebrado: Josi, Fabi e Gilson.

Às amigas Fabiana e Josiane pelas discussões, carinho, apoio, choros, risos e grande amizade.

Aos funcionários da Fazenda São Francisco: Carlinhos, Sr. Antonio, Tião, Geraldo e Adriana.

Aos funcionários do laboratório/DZO (Márcio e Eliane) pelo grande apoio.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa trajetória.

RESUMO

O objetivo do experimento foi avaliar se a suplementação de vacas em lactação com produtos contendo diferentes tipos de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* induziria uma resposta diferente no desempenho lactacional, digestibilidade, concentração de niacina plasmática, perda de calor evaporativo e imunidade durante o verão brasileiro (ITU > 68 para 86,4 % do tempo). Trinta vacas da raça Holandês (169 ± 87 DEL) foram alimentadas individualmente em dieta padronizada por duas semanas, correspondendo ao período de covariável, blocadas por paridade antes do tratamento por 56 dias. Os tratamentos foram produtos contendo SC 47 ou NCYC 996 (Phileo Lesaffre) ou Controle (CTL). Os contrastes pré-planejados foram: C1) CTL vs. SC 47 + NCYC 996 e C2) SC 47 vs. NCYC 996. Os produtos de leveduras (10 g/vaca/dia) foram misturados à uma medida de milho moído e fornecido em cima do trato da manhã. As células viáveis e não-viáveis em células/grama foram: : 1,00 x 10¹⁰ e 1,03 x 10¹⁰ para SC 47 e 1,76 x 10¹⁰ e 0,93 x 10¹⁰ para NCYC 996, respectivamente. Os produtos de levedura não afetaram a produção de leite (35,8 kg/d), sólidos (1,048 proteína, 0,953 gordura e 1,572 lactose em kg/d) e CMS (19,4 kg/d). A concentração de niacina não diferiu. A temperatura retal às 19 horas tendeu ser menor no tratamento NCYC 996 que no SC 47 (39,1 vs. 39,4°C), e a frequência da temperatura retal ≥ 39,2°C foi reduzida às 13 horas (37,5 vs. 48,1%) e às 19 horas (41,8 vs. 58,1%) no tratamento NCYC 996 comparado ao CTL. A frequência respiratória e a taxa de sudorese não mudaram com o tratamento. Os escores de CCS Linear foram 4,94 para o CTL (384.000 células/mL), 4,17 para SC 47 (225.000 células /mL) e 4,37 para NCYC 996 (258.000 células /mL) (*P* < 0,01 para C1). A resposta imune celular foi avaliada nos dias -1, 7 e 15 e a resposta humoral nos dias -1, 7 e 23 relativos à vacinação com vacina anti-rábica inativada no dia 35. O título de anticorpos antirrâbicos no soro e Interleucina-4 (IL-4) aumentaram e Interferon gama (IFN γ) foi reduzido em resposta à vacinação. Os monócitos do sangue foram reduzidos por NCYC 996 comparado ao SC 47 no dia -1 e aumentaram no dia 15. Comparado ao SC47, NCYC 996 também tendeu aumentar IL-4 no dia -1 e reduziu IL-4 no dia 15. Os títulos de anticorpos anti-râbicos e IFN γ não foram afetados pelo tratamento. A digestibilidade aparente do trato total dos nutrientes e a excreção diária de alantoína não tiveram diferença. Os produtos de leveduras aumentaram o tempo de ingestão por dia e por unidade de CMS e o tempo de duração de refeição relativo ao CTL, com similar CMS. As vacas no tratamento NCYC 996 apresentaram seleção a favor de partículas > 19 mm à noite (118%) e SC 47 induziu rejeição de partículas longas. As concentrações de glicose e N-ureico do plasma não diferiram entre os tratamentos. A suplementação com produtos de levedura não teve impacto no desempenho animal e digestibilidade, mas reduziu a CCS do leite. O efeito na resposta imune celular e termorregulação diferiram entre os produtos de levedura avaliados. A suplementação com levedura tendeu aumentar IL-4 após a vacinação, tendeu reduzir os monócitos do sangue antes da vacinação e reduziu a CCS do leite.

Palavras-chave: estresse calórico, mastite, contagem de células somáticas, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

This experiment evaluated if the supplementation of lactating dairy cows with products containing different strains of live *Saccharomyces cerevisiae* would induce differential response in lactation performance, digestibility, plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and immunity during Brazilian summer (THI > 68 for 86.4% of time). Thirty Holsteins (169 ± 87 DIM) were individually fed on TMR for a 2-week covariate period and then paired blocked before assignment to a treatment for 56 d. Treatments were products containing strains SC 47 or NCYC 996 (Phileo Lesaffre) or Control (CTL). Pre-planned contrasts were: C1) CTL vs. SC 47 + NCYC 996 and C2) SC 47 vs. NCYC 996. Yeast products (10 g/cow/d) were mixed to a cup of ground corn and top dressed to the TMR in the morning. Viable and non-viable cells/g were: 1.00 x 10¹⁰ and 1.03 x 10¹⁰ for SC 47 and 1.76 x 10¹⁰ and 0.93 x 10¹⁰ for NCYC 996, respectively. Yeast products did not affect the yields of milk (35.8 kg/d) and solids (1.048 kg/d protein, 0.953 kg/d fat and 1.572 lactose) and DMI (19.4 kg/d). Plasma niacin concentration did not differ. The rectal temperature at 1900 h tended to be lower (39.1 vs. 39.4°C) on NCYC 996 relative to SC 47 and the frequency of rectal temperature ≥ 39.2°C was reduced at 1300 h (37.5 vs. 48.1%) and 1900 h (41.8 vs. 58.1%) on NCYC 996 relative to CTL. The respiratory frequency and sweating rate did not change. The Linear SCC scores were 4.94 for CTL (384,000 cells/mL), 4.17 for SC 47 (225,000 cells/mL), and 4.37 for NCYC 996 (258,000 cells/mL) ($P < 0.01$ for C1). The cell-mediated immune response was evaluated on days - 1, 7, and 15 and the humoral response on days - 1, 7, and 23 relative to vaccination with an inactivated rabies vaccine on d 35. The titer of rabies antibodies in serum and Interleukin-4 (IL-4) were increased and Interferon Gamma (IFN γ) was reduced in response to vaccination. Monocytes in blood were reduced by NCYC 996 relative to SC 47 on d - 1 and were increased on d 15. Compared to SC 47, NCYC 996 also tended to increase IL-4 on d - 1 and reduced IL-4 on d 15. The titer of rabies antibodies and IFN γ were not affected by treatment. The total tract apparent digestibility of nutrients and the daily urinary allantoin excretion did not differ. Yeast products increased ingestion time per day and per unit of DMI and meal duration relative to CTL, at similar DMI. Cows on NCYC 996 showed selective sorting behavior in favor of feed particles > 19 mm at night and SC 47 induced rejection of long feed particles. Glucose and urea-N concentrations in plasma did not differ. Yeast supplementation had no impact on animal performance and diet digestibility, but reduced milk SCC. The effect on cell-mediated immune response and thermoregulation differed between the yeast products evaluated. Yeast supplementation tended to increase IL-4 after vaccination, tended to reduce blood monocytes before vaccination, and reduced milk SCC.

Key words: heat stress, mastitis, milk somatic cell count, *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Temperature, humidity, and Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall during the 56-d comparison period. 2688 recordings at 30-min intervals.....	90
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperature-Humidity Index (THI), temperature (°C), and humidity (%) at the center of the tie stall.....	77
Tabela 2 - Concentration of viable and non-viable yeast cells in products containing strains NCYC 996 and SC 47 on d 21 and d 56 of the experiment.....	78
Tabela 3 - Composition of the diets (% of DM) on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	79
Tabela 4 - Intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, and Linear SCC on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	80
Tabela 5 - Rectal temperature and respiration rate measured twice per week at 0700, 1300, and 1900 h, sweating rate measured once per week at 1500 h, and plasma niacin concentration at 1300 h on d 14 and d 56 on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	81
Tabela 6 - Proportion of cows/observations (%. N = 160/treatment) with rectal temperature $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ at 0700, 1300, and 1900 h on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	82
Tabela 7 - Urinary allantoin excretion, total-tract apparent digestibility of nutrients, digestible OM intake (DOMI), and the ratio of ECM to DOMI on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	83
Tabela 8 - Plasma glucose concentration 0, 2, 4, and 12 h post-feeding on weeks 2, 4, 6, and 8 and plasma urea-N (PUN) 0, 2, and 4 h post-feeding on weeks 4 and 8 on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	84
Tabela 9 - Dry matter intake on d 42 during the evaluation of chewing activity and ingestion behavior on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....	85

- Tabela 10 - Proportion of daily intake in periods of the day and particle size sorting behavior on d 45 on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996.....86
- Tabela 11 - Complete hemogram at the day before vaccination (Day - 1) and on days 7 and 15 after vaccination on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996. The rabies vaccination was performed on d 36 of the comparison period.....87
- Tabela 12 - Serum cytokines and titer of rabies antibodies at the day before vaccination (Day - 1) and on days 7, 15, and 23 after vaccination on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 9966. The rabies vaccination was performed on d 36 of the comparison period.....89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Resposta imunológica.....	15
2.1.1	Resposta imune inata.....	15
2.1.2	Resposta imune adaptativa	18
2.1.2.1	Imunidade de mucosas e resposta imune no intestino.....	20
2.2	Estresse calórico.....	22
2.2.1	Estresse calórico e metabolismo.....	22
2.2.2	Estresse calórico e função imune.....	24
2.3	Leveduras.....	25
2.3.1	Mecanismo de ação das leveduras.....	28
2.3.1.1	Ação ruminal.....	28
2.3.1.2	Consumo de matéria seca e resposta animal.....	29
2.3.1.3	Digestão da fibra.....	31
2.3.1.4	Temperatura corporal.....	32
2.3.2	Leveduras como probióticos e imunomodulação.....	36
3	REFERÊNCIAS.....	42
4	ARTIGO.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos que ao serem suplementados na dieta de vacas leiteiras podem trazer efeitos benéficos ao desempenho, saúde ou eficiência da produção animal. Estes devem ser não patogênicos e não tóxicos, devem conter células viáveis que sejam capazes de sobreviver ao trato gastrointestinal do hospedeiro e devem se manter viáveis por longos períodos de armazenamento (FULLER, 1989). As células vivas e mortas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são comumente utilizadas como aditivo zootécnico (European Commission http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/legisl_en.htm) nas dietas de vacas leiteiras (DESNOYERS et al., 2009; POPPY et al., 2012). A viabilidade das células varia muito entre os produtos comerciais, sendo que na maioria deles são encontrados uma mistura de leveduras mortas e vivas (SALVATI et al., 2015) ou produtos com leveduras mortas apenas (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008). As cepas de leveduras apresentam diferenças quanto à sua atividade metabólica, resposta imunológica e mecanismo de ação ruminal (NEWBOLD et al., 1995; POSADAS et al., 2017).

O estresse calórico causa imenso prejuízo à indústria leiteira mundial por afetar negativamente a saúde e o desempenho de vacas leiteiras, induzindo redução do consumo, ganho de peso, produção de leite, eficiência reprodutiva e em casos mais graves pode causar mortalidade de animais (BAUMGARD; RHOADS, 2012). A suplementação de produtos de leveduras pode aumentar a produção de niacina no rúmen, induzindo aumento na vasodilatação periférica e na sudorese, aumentando a perda de calor evaporativo e reduzindo a exigência nutricional de manutenção da temperatura corporal, o que é capaz de induzir ganho em eficiência leiteira (Leite/Consumo) de vacas submetidas a estresse por calor (SALVATI et al., 2015; DIAS et al., 2018).

As leveduras podem atuar como imunomoduladores melhorando a resistência do hospedeiro contra microrganismos patogênicos. Em bovinos leiteiros podem melhorar as respostas protetoras em locais vulneráveis como as glândulas mamárias (DHAMA et al., 2015), favorecendo a diminuição da contagem de células somáticas do leite (ZAWORSKI et al., 2014).

O objetivo deste experimento foi avaliar a existência de variabilidade na capacidade de duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de estimular a função ruminal, o desempenho leiteiro, a concentração de niacina no plasma, a perda de calor evaporativo e a imunidade de vacas leiteiras durante os meses quentes do verão da região Sudeste do Brasil. Trabalhou-se com a hipótese de que a suplementação com produtos de leveduras vivas pode melhorar o desempenho leiteiro por aumentar a digestibilidade da dieta, a imunidade e a dissipação de calor e o tipo de produto pode determinar a resposta animal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resposta imunológica

O sistema imunológico do hospedeiro deve ser capaz de reconhecer os antígenos próprios dos não próprios, perigosos e inócuos, para ser capaz de montar uma resposta e eliminar microrganismos patogênicos e/ou possíveis ameaças sem causar dano aos próprios tecidos (CHAPLIN, 2010). O mecanismo de defesa do animal entra em ação quando os microrganismos patogênicos conseguem atravessar as barreiras externas (pele, epitélio, membranas) ou quando ocorrem lesões que iniciam respostas imunes inatas e respostas imunes adaptativas (MOSER; LEO, 2010; TURVEY; BROIDE, 2010).

2.1.1 Resposta imune inata

A resposta imunológica inata é a primeira linha de defesa do organismo que faz com que a maioria dos microrganismos ou outras formas de agravo (o estresse, por exemplo) que quebram as barreiras externas, sejam rapidamente detectados e eliminados ou contidos (CARROLL; FORSBERG, 2007). A resposta imune inata apresenta componentes celulares e humorais. Os componentes celulares são de origem hematopoiética e não hematopoiética, constituindo-se de células que são residentes nos tecidos e células móveis que percorrem o corpo pela circulação sanguínea e linfática. As células de origem não hematopoiéticas incluem as células epiteliais da pele e mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital. Os macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células natural killer (NK) são células de origem hematopoiética (TURVEY; BROIDE, 2010; MOSER; LEO, 2010).

Os componentes humorais constituem-se de citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda, incluindo aqui as proteínas do complemento. O sistema complemento apresenta mais de 30 proteínas que podem ser ativadas por três vias: clássica, alternativa e a via da lectina, em forma de uma cascata enzimática que vai desencadear na formação de um complexo de ataque à membrana que leva à destruição das células alvo (CARROL, 2004; NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012). A via clássica é ativada por anticorpos, enquanto que a via alternativa pode ser ativada sem a presença de anticorpos, apenas pela ligação com os microrganismos através de cofatores que

reconhecem os microrganismos (BEUTLER, 2004). A via da lectina é ativada pela ligação da lectina ligante de manose a resíduos de manose presentes na superfície dos microrganismos (CARROL, 2004).

As citocinas são proteínas produzidas e liberadas durante a resposta imunológica pelas células imunes inatas e atuam nas interações e na comunicação entre as células (LACY; STOW, 2011). Os maiores produtores de citocinas são as células T auxiliares (Th) e os fagócitos mononucleares. As citocinas produzidas por linfócitos podem ser chamadas de linfocinas, as produzidas pelos monócitos de monocinas, as citocinas com atividade quimiotática de quimiocinas e as citocinas que são produzidas por um leucócito e atuam em outros leucócitos são chamadas de interleucinas (ZHANG; AN, 2007). As citocinas podem ser classificadas em citocinas pró-inflamatórias: interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon-gama (INF- γ), IL-12, IL-18 e citocinas anti-inflamatórias: IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, INF- α e fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) (CARROLL; FORSBERG, 2007; ZHANG; AN, 2007).

Após os microrganismos atravessarem as barreiras externas, inicia-se a resposta imune inata através do reconhecimento dos patógenos pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) que reconhecem os componentes microbianos, os chamados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que incluem lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, flagelinas e DNA CpG não metilado (AKIRA et al., 2006), e também os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que são os produtos resultantes de uma infecção, constituintes intracelulares (como ATP, ácido úrico, proteínas de choque térmico) que são liberados quando ocorre dano celular por infecção, estresse ou trauma (SHI et al., 2003). Os RRP podem ser encontrados na forma de proteínas humorais circulantes como as proteínas do complemento e em diferentes tipos celulares e podem estar presentes tanto na membrana plasmática como os TLR (*Toll-Like Receptors*), quanto no citoplasma, como os receptores NLR (Nucleotide-binding domain leucine-reach) e NOD (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD-Like Receptors). A grande variedade de RRP é capaz de reconhecer diferentes PAMPs possibilitando a identificação de diferentes tipos de microrganismos patogênicos (CARROLL; FORSBERG, 2007; CHAPLIN, 2010). A ligação dos receptores com os PAMPs ocorre em sítios de ligação contendo proteínas que são

ativadas e por sua vez vão ativar outras proteínas até ativar a célula, ativando assim fatores de transcrição, como o fator nuclear kapa B (NF- κ B), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, maturação de células dendríticas (BEUTLER, 2004; TURVEY; BROIDE, 2010), levando à destruição dos microrganismos pelas células fagocitárias ou pelo sistema complemento (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Os DAMPs são reconhecidos pelos RRP, dentre eles TLR e RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End Products*), que assim como os PAMPs, após a sua ligação ativação de proteínas, ativa o fator de transcrição NF- κ B e produção de citocinas pró-inflamatórias. Uma característica particular dos DAMPs é a ativação do inflamassoma NLRP3, uma proteína (caspase) que induz a liberação de IL-1 β nos macrófagos (SCHAEFER, 2014). As células NK contribuem na ativação de processos imunológicos através da secreção de altos níveis de citocinas e não dependem de um antígeno para serem ativadas, quando entram em contato com os microrganismos liberam substâncias químicas que danificam a membrana celular e invadem a célula para destruí-la. (CARROLL; FORSBERG, 2007).

As citocinas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da resposta de fase aguda e crônica, e através da comunicação celular desencadeiam respostas em tecidos que se encontram distantes do local da infecção. Com o desenvolvimento das infecções no hospedeiro surgem efeitos secundários como a febre e a produção de proteínas de fase aguda, que vão auxiliar a resposta imune (BEUTLER, 2004). As proteínas de fase aguda são proteínas presentes no sangue e durante a resposta inflamatória podem alterar a sua concentração sérica em mais de 25% em resposta às citocinas pró-inflamatórias (ECKERSALL; BELL, 2010). As proteínas de fase aguda são produzidas pelos hepatócitos no fígado e apresentam um papel importante durante os estágios de inflamação quando tem sua produção aumentada (chamada de proteína de fase aguda positiva) ou diminuída (proteína de fase aguda negativa), pois atuam como mediadores nas funções imunes, promovendo o transporte de produtos gerados durante a inflamação e participam na reparação e remodelação tecidual (CARROLL; FORSBERG, 2007). A haptoglobina é a principal proteína da resposta de fase aguda nos ruminantes; a proteína amiloide sérica A apresenta elevada produção em casos de inflamações agudas, sendo as duas muito utilizadas como

biomarcadores para detectar casos de inflamações nos rebanhos leiteiros (ECKERSALL; BELL, 2010).

2.1.2 Resposta adaptativa

Quando a resposta inata não é suficiente para eliminar ou neutralizar os antígenos, a resposta adaptativa é iniciada. A resposta adaptativa constrói uma resposta específica para cada determinante antigênico (epítomos). Assim, a produção de anticorpos é uma característica da resposta e ocorre para combater antígenos específicos (CARROLL; FORSBERG, 2007). A alta mutação e replicação dos patógenos desencadeia a resposta adaptativa que envolve a produção de anticorpos e reconhecimento por receptores de células T. Os receptores são expressos pelos linfócitos T e B, que são células fundamentais para a resposta adaptativa (MOSER; LEO, 2010).

Um segundo encontro do mesmo antígeno com o hospedeiro resulta em aumento da velocidade e intensidade da resposta como consequência da memória imunológica. O sistema imune consegue reconhecer antígenos próprios de não próprios através de proteínas de membrana, o chamado “complexo de histocompatibilidade principal” (MHC) (SORDILLO; STREICHER, 2002). Após a ligação com o receptor, ocorre a captação e a fagocitose dos patógenos pelas células apresentadoras de antígenos (APC), principalmente macrófagos e células dendríticas. O processamento das proteínas que são derivadas dos microrganismos ocorre nos lisossomos e geram epítomos que vão formar um complexo com o MHC de classe II na superfície da APC. A presença de citocinas pró-inflamatórias e PAMPs induzem a expressão de moléculas clássicas de MHC e co-estimuladores (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; KISELEVA; NOVIK, 2013). As células dendríticas são as células do sistema imune inato que apresentam um papel fundamental no controle da resposta imune adaptativa, pois são as mais efetivas APC para célula T e direcionam a especialização e ativação da resposta imune celular. A sua localização, os marcadores de superfície e o perfil de citocinas influenciam a célula dendrítica, e consequentemente o perfil da resposta imune (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

A expressão do receptor de célula T $\alpha\beta$ (TCR) determina a principal classe de células T, o qual reconhece o antígeno na forma de um complexo MHC/peptídeo que

são expressos pelas células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, onde o MHC de classe I e MHC de classe II estão em interface com T citotóxicas (TCD8+) e T auxiliares (TCD4+), respectivamente. As células T $\alpha\beta$ são diferenciadas em subconjuntos, onde TCD8+ secretam mediadores solúveis que são capazes de inibir a replicação do patógeno e/ou levar a morte de células infectadas (MOSER; LEO, 2010) e TCD4+ agem principalmente na regulação da resposta imunológica (CHAPLIN, 2010).

As células TCD4+ podem ser diferenciadas em perfil de resposta Th1, Th2, Th3, Th17, Th22, dependendo das condições do microambiente de citocinas. A liberação de citocinas é um processo que é regulado de forma personalizada para que o sistema imune possa montar uma resposta mais adequada (LACY; STOW, 2011; KISELEVA; NOVIK, 2013).

O perfil de citocinas associado ao sistema imune inato vai direcionar a resposta inicial adaptativa. As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-12 e TNF- α (fator de necrose tumoral) promovem o desenvolvimento de um perfil de resposta celular Th1, enquanto que IL-4, IL-10, IL-13 e o fator transformador de crescimento – β (TGF- β) promovem uma resposta predominantemente humoral Th2 (KISELEVA; NOVIK, 2013).

A resposta Th1 é desencadeada pelas células Th1 que ativam os macrófagos para fagocitar e destruir os microrganismos. Apresenta como citocina de assinatura o IFN γ que é a principal citocina de ativação dos macrófagos M1. Apresenta resposta eficiente contra leveduras, protozoários, bactérias, vírus e toxinas. A resposta Th2 tem a IL-4 como citocina de assinatura e é uma resposta efetiva à parasitos helmintos, ectoparasitos e manutenção da gestação normal (WEGMANN et al., 1993; MORELLI et al., 2015), uma resposta humoral que estimula a produção de anticorpos imunoglobulina E (IgE) e ativam eosinófilos e mastócitos para eliminação dos patógenos (MOSER; LEO, 2010). A estimulação da produção de IL-4 através da ligação das células ao receptor de na superfície da célula, é composta por uma ativação de várias vias de sinalização sendo que uma das cadeias específicas envolve transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT). STAT são proteínas que são responsáveis por mediar respostas induzidas por citocinas. A IL-4 é secretada por diversos tipos celulares incluindo linfócitos T, mastócitos e basófilos. A IL-4 é essencial para a indução da síntese de IgE

que é ativada por linfócitos B e pelo fator STAT 6 que é um fator importante para aumentar a expressão de genes para a sua liberação (KAPLAN et al., 1996).

2.1.2.1 Imunidade de mucosas e resposta imune no intestino

Os tecidos linfóides associados às mucosas (MALT) estão presentes por todo o trato gastrointestinal, vias respiratórias e trato urogenital. O MALT é um sistema altamente compartimentado e apresenta mecanismos específicos que fazem com que a imunidade seja independente da imunidade sistêmica. Apesar dessa especificidade, a compartimentalização faz com que o sistema de mucosa tenha ligação dos seus locais indutivos aos locais efetores. Essa ligação se dá através da expressão de quimiocinas, citocinas e integrinas. Um exemplo é a ligação do intestino com a glândula mamária e o nariz com o trato respiratório e mucosa genital (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

O intestino, assim como a pele, as vias aéreas e o trato reprodutivo dos mamíferos estão sempre expostos a um grande número de microrganismos do ambiente como vírus, bactérias, fungos e parasitas letais que podem invadir e colonizar a superfície mucosa. Entretanto, ocorre também a presença de antígenos e microrganismos comensais que convivem em simbiose e podem trazer benefícios para o hospedeiro ou o contato com antígenos inócuos (ARTIS, 2008; TURNER, 2009). O intestino é o órgão mais importante de comunicação entre o ambiente e o corpo, pois apresenta a maior área de superfície mucosa. Assim, está em constante estímulo imunológico o que lhe confere um desafio regulatório único frente ao sistema imune de mucosa (BRANDTZAEG, 2013; ARTIS, 2008).

As células epiteliais que recobrem a mucosa exercem um papel fundamental para mediar as interações entre o ambiente externo e o MALT. A camada epitelial é composta por junções oclusivas intracelulares e possuem extensões microvilares ricas em actina que formam uma borda em escova por toda a superfície apical do epitélio, impedindo a ligação e invasão dos patógenos (SHEN; TURNER, 2006). Complementando a barreira física, ocorrem adaptações bioquímicas como o glicocálice que é formado por uma camada rica em mucinas secretadas pelas células caliciformes (ARTIS, 2008). Moléculas antimicrobianas, secretadas pelas células epiteliais em interação com a microbiota normal, são liberadas em resposta aos PAMPs evitando uma invasão ao hospedeiro sem que ocorra produção de citocinas pró-inflamatórias

prevenindo uma possível destruição do tecido por uma resposta inflamatória excessiva (UEHARA et al., 2007). Embora a camada epitelial tenha uma função de barreira, apresenta permeabilidade, necessária para a troca de fluidos e íons que são essenciais para manter as funções específicas dos tecidos (TURNER, 2009), promovem a digestão e absorção dos nutrientes e criam uma barreira contra grandes partículas, incluindo os microrganismos que estão em contato direto com a camada epitelial (ARTIS, 2008).

Um grande número de células especializadas e APC, incluindo as células dendríticas, estão presentes ao longo do folículo associado ao epitélio que recobre as placas de Peyer (COOMBES; POWRIE, 2008). As células dendríticas estendem seus dendritos e atingem o lúmen intestinal (RESCIGNO et al. 2001) alcançando os antígenos e assim expressam RRs, incluindo TLR que reconhecem os PAMPs (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; KISELEVA; NOVIK, 2013). As células epiteliais também expressam TLR e receptores intracelulares de nucleotídeo, como os NOD e NLR. Esses receptores apresentam domínios no lúmen e intracelular. A ligação de TLR e NLR resultam na ativação de resposta imune inata, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (KISELEVA; NOVIK, 2013; ARTIS, 2008). Assim, as células epiteliais do intestino com sua função de barreira e expressando RRP influenciam o início da resposta imune antimicrobiana. As respostas imunes na mucosa são determinadas pela natureza do antígeno, o tipo de APC envolvida e o microambiente local (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

Como a maioria dos antígenos no intestino são não patogênicos, o caminho padrão para a célula dendrítica e outras APC gera um perfil de resposta Th2 e outros tipos de respostas de células T regulatórias, o que resulta numa regulação da imunidade sistêmica, a chamada tolerância oral (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). A tolerância oral é uma característica do epitélio saudável que depende da sua capacidade em controlar a passagem de antígenos intactos do lúmen intestinal para a lâmina própria. Esse fenômeno ocorre para inibir uma reação às proteínas da dieta e componentes da microbiota comensal, desde que seja mantida a integridade da barreira epitelial (BRANDTZAEG, 2013). As estruturas linfóides, incluindo as placas de Peyer e folículos linfóides, presentes na lâmina própria e ao longo de todo o trato intestinal, contribuem para manter o equilíbrio entre imunidade e tolerância na superfície da mucosa (ARTIS, 2008).

2.2 Estresse calórico

2.2.1 Estresse calórico e metabolismo

O Índice de Temperatura e Umidade (ITU), calculado através da temperatura e umidade relativa do ar, é um índice utilizado para determinar o estresse calórico em bovinos. O valor de 72, (ARMSTRONG, 1994) tradicionalmente usado vem sendo substituído por 68, o qual foi determinado através da avaliação de parâmetros fisiológicos e produtivos para vacas que produzem acima de 35 kg de leite por dia (ZIMBELMAN et al., 2009, COLLIER et al., 2012).

As vacas leiteiras de alta produção apresentam alto nível de ingestão e como consequência uma alta produção de calor metabólico, associada à fermentação ruminal e à produção de leite, tornando-as extremamente sensíveis ao estresse térmico. As características de estresse como o aumento da temperatura retal, elevadas taxas de respiração e depressão no consumo contribuem efetivamente para um decréscimo na produção de leite. Dessa maneira é importante conhecer como o estresse altera a partição e a utilização dos nutrientes pelo animal para desenvolver estratégias de manejo que possam evitar grandes perdas durante este período de desafio para o desempenho animal (BAUMGARD; RHOADS, 2012).

Rhoads et al. (2009) avaliaram os efeitos diretos e indiretos do estresse calórico (EC) nos índices fisiológicos e metabólicos de vacas de alta produção em câmaras climáticas. As vacas foram divididas em dois grupos e submetidas a dois períodos experimentais. O primeiro período (P1) sob condições termoneutras (TN) e consumo *ad libitum* por nove dias e o segundo período (P2) o grupo um foi mantido em condições TN e o segundo grupo foi submetido à EC por nove dias. O consumo de matéria seca (CMS) diminuiu para os dois grupos em relação ao P1 (TN) e foi igual para os dois grupos no P2. A produção de leite reduziu em maior proporção para o grupo em EC, indicando que o CMS foi responsável por somente 35 % da redução do leite produzido. De forma similar, vacas em lactação foram submetidas a três períodos experimentais por Wheelock et al. (2010) que observaram uma redução de aproximadamente 30 % no CMS do grupo dois no P2 em relação ao P1 e somente 50 % da queda na produção de leite foi atribuída ao menor CMS. A queda da produção de leite observada nesses experimentos foi atribuída às mudanças no metabolismo energético pós-absortivo.

O consumo reduzido de energia dietética somado ao aumento dos custos de manutenção durante o período de estresse térmico pode levar o animal a um balanço energético negativo (BEN), semelhante ao que ocorre com as vacas no início da lactação (BERNABUCCI et al., 2010). A utilização da glicose em condições de estresse calórico é aumentada provavelmente devido ao aumento da insulina que estimula a gliconeogênese e reduz mobilização de ácidos graxos não esterificados, direcionando a glicose para os tecidos periféricos para aumentar a dissipação de calor (WHEELLOCK et al., 2010). Entretanto, esta glicose vai ser utilizada por outros tecidos e não para a produção de leite (BAUMGARD; RHOADS, 2013).

Com a redução do CMS durante o estresse calórico, os aminoácidos também podem ser mobilizados para fornecer substrato energético ao metabolismo animal. Pode ocorrer degradação de proteína que pode ser resultado do aumento do catabolismo proteico ou resultado direto da lesão muscular pelo calor (RHOADS et al., 2013). Como consequência, verifica-se um aumento do nitrogênio ureico do plasma, podendo diminuir a síntese proteica do leite (RHOADS et al., 2009).

As vacas submetidas ao estresse térmico apresentam diversas respostas fisiológicas como aumento da sudorese, aumento da temperatura retal e aumento da frequência respiratória (KADZERE et al., 2002). O estresse calórico pode ocasionar alterações no equilíbrio ácido-básico e induzir aumento de insulina. O aumento da perda de CO₂ pela hiperventilação pulmonar, devido ao aumento da frequência respiratória, reduz a concentração de ácido carbônico que é utilizado como bicarbonato para manter o pH do sangue, resultando numa alcalose respiratória (DAVENPORT, 1974). Aumenta a perda de bicarbonato pela urina e como tentativa em conter uma alcalose respiratória, os rins retêm os íons hidrogênio, resultando em acidose metabólica compensatória. A acidose metabólica interfere na sensibilidade dos tecidos à insulina, resultando numa resistência à insulina, o que leva ao seu aumento no organismo (BAUMGARD; RHOADS, 2013).

A perda de calor pelo animal ocorre por condução, convecção, radiação, evaporação de água e através da respiração, um processo contínuo que acontece a todo tempo e aumenta com o estresse calórico pela perda adicional por evaporação (KADZERE et al., 2002). Com o redirecionamento do fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos, ocorre uma redução do fluxo sanguíneo no trato gastrointestinal,

comprometendo a absorção dos ácidos graxos voláteis (AGV) que se acumulam no rúmen e induzem uma queda no pH ruminal (BERNABUCCI et al., 2010). Somando essas alterações com a falta de bicarbonato que está sendo excretado pelos rins, as vacas sob estresse calórico estão mais susceptíveis a desenvolver acidose ruminal (KADZERE et al., 2002).

O comportamento ingestivo de vacas sob condições de estresse calórico podem contribuir também para acidose ruminal. Vacas em condições de estresse calórico podem diminuir para três a cinco refeições diárias das 12 a 15 refeições que realizam por dia. O número reduzido de refeições implica em refeições mais longas que vão produzir mais ácidos graxos voláteis após o consumo, podendo desencadear uma acidose ruminal (BERNABUCCI et al., 2010).

2.2.2 Estresse calórico e função imune

O estresse calórico pode alterar as funções da resposta imunológica através de mudanças neuroendócrinas em vacas de leite. O aumento da temperatura da superfície da pele acima de 35 °C provoca nos animais um armazenamento de calor e desencadeiam os mecanismos de perda de calor por evaporação que, por sua vez ativam os mecanismos de resposta ao estresse calórico (COLLIER et al., 2008). Aumento da concentração plasmática de cortisol, aumento de leucócitos polimorfonucleares e aumento da resposta humoral através do aumento de anticorpos foram observados em vacas submetidas a estresse térmico (LACETERA et al., 2005). O controle da resposta imune pelo sistema nervoso central é realizado através de uma rede complexa de sinais que interligam os sistemas nervoso, endócrino e imunológico. A função imune pode ser alterada por dois principais eixos: hipotálamo-hipófise-adrenal e simpático-medula adrenal (PADGETT; GLASER, 2003).

As células estressadas, danificadas ou mortas liberam os DAMPs. Os DAMPs são rapidamente detectados pelos RRP que iniciam uma resposta imunológica para neutralização, destruição e reparação tecidual para manter a homeostase (SCHAEFER, 2014).

As proteínas de choque térmico são um exemplo de DAMPs que são liberadas durante o estresse calórico para proteger o organismo. As alterações na expressão gênica incluem a ativação do fator de transcrição do choque térmico; aumento da

expressão de proteínas de choque térmico e diminuição da expressão de outras proteínas; aumento da oxidação de glicose e aminoácidos e redução do metabolismo de ácidos graxos; ativação do sistema endócrino da resposta ao estresse e ativação do sistema imunológico através da secreção de proteínas de choque térmico (COLLIER et al., 2008). Os hormônios glicocorticoides podem influenciar na regulação da expressão de genes do sistema imune, desencadeando ações diferentes dependendo do tipo celular envolvido. Os receptores dos glicocorticoides ativados podem se ligar ao fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- κ B), impedindo a sua migração para o núcleo, o que interfere na regulação da expressão de citocinas de algumas células como os macrófagos e células T auxiliares (CARROLL; FORSBERG, 2007). Assim como ocorre o aumento dos glicocorticoides durante o período de estresse, as catecolaminas (epinefrina e noraepinefrina) produzidas pela medula adrenal tem a sua produção elevada e também ocasionam alterações na expressão de genes da resposta imune (PADGETT; GLASER, 2003).

2.3 Leveduras

As leveduras são microrganismos unicelulares e sua denominação mais adotada é de pertencerem ao reino *Funghi* e serem subdivididas em ascomicetos ou basidiomicetos que podem se reproduzir assexuadamente por brotamento ou fissão. Sobrevivem tanto em meio com presença ou ausência de oxigênio, no entanto se reproduzem melhor na presença de oxigênio (TORTORA et al., 2000).

A espécie mais estudada é *Saccharomyces cerevisiae*, pois é utilizada há milhares de anos na fabricação de pães e bebidas. Assim, devido à sua grande utilização industrial e biotecnológica, a *S. cerevisiae* é a levedura mais utilizada na alimentação de ruminantes (MARTIN; NISBET, 1992).

Os produtos de *S. cerevisiae* utilizados diferenciam-se pela quantidade de células viáveis, as quais são fornecidas em maior número (> 10 bilhões ufc/g) quando se fornece levedura viva do que quando se utiliza cultura de leveduras. A biomassa da levedura é liofilizada para preservar a viabilidade celular e a atividade metabólica. As leveduras vivas são produtos que contém maior número de células viáveis do que não-viáveis e os produtos contendo cultura de levedura apresentam células não viáveis misturadas com o meio de crescimento. Outra forma de utilização é através de produtos

que não possuem células viáveis e são usados como ingrediente nutricional (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008), como a parede de levedura, que contém manoproteínas e β -glucanos (KLIS et al., 2006).

A característica de viabilidade que reflete se a célula está viva ou morta é diferente da característica de vitalidade da célula. A vitalidade depende da capacidade fisiológica da célula, ou seja, dependendo das alterações das características metabólicas a célula não consegue se reproduzir, no entanto, a mesma permanece viva (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014; KREGIEL; BERLOWSKA, 2009). O teste de viabilidade utilizando azul de metileno é um teste com boa aplicabilidade para determinar a viabilidade das células (LEE; ROBINSON; WANG, 1981). Apresenta a vantagem de ser um teste barato, com determinação rápida e quando comparado com o crescimento em placas, em que é necessário o tempo maior de espera para a contagem das colônias que são capazes de se reproduzir e crescer no meio de cultura e que considera as células que não se reproduziram estando mortas, destaca-se por apresentar a contagem das células vivas que podem ser incapazes de se reproduzir, entretanto continuam vivas (KUCSERA; YARITA; TAKEO, 2000; KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014).

Os efeitos da temperatura de armazenamento na viabilidade celular de produtos comerciais de leveduras foram avaliados por Sullivan e Bradford (2011). Oito produtos comerciais foram avaliados e destacaram que por ser um número limitado de amostras, obtiveram amostras de vários lotes dos produtos para serem mais representativas. Os produtos utilizados foram: A) Yea-Saac¹⁰²⁶ (Alltech, Nicholasville, KY); B) Yea-Saac¹⁰²⁶ Farm Pak 2 X (Alltech); C) Biomate Yeast Plus (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca); D) Levucell SC FarmPak (Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, França); E) Procreatin-7 (SAF Agri, Milwaukee, WI); F) FermaStar (Animal Science Products, Nacogdoches, TX); G) Biosaf (SAF Agri) e H) Levucell SC20 (Lallemand Animal Nutrition). Amostras de aproximadamente 400 g foram armazenadas em sacos escuros, vedados e armazenados a 4 °C até as análises. A contagem das células viáveis foi realizada em até três semanas do recebimento do produto. Uma subamostra de cada produto (aproximadamente 50 g) foi armazenada num incubador com temperatura de 40 °C com umidade ambiente e a contagem das células viáveis foi realizada após 1, 2 e 3 meses de armazenamento. A contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) foi

realizada diluição seriada (1:10) e incubação dos produtos por 5 dias em placas sob temperatura de 25 °C. As placas contendo entre 15 e 300 colônias foram contadas. Cada diluição foi plaqueada em triplicata e a média das três placas foi analisada. As concentrações de ufc/g variaram muito nos produtos comerciais. Somente o produto E manteve as concentrações garantidas pelo fabricante nas três amostras coletadas. Entretanto, os produtos A e F tiveram concentrações maiores do que a garantia pelo fabricante. A alta temperatura (40 °C) de estocagem diminuiu a viabilidade ($P < 0,001$) sendo que a média de ufc/g diminuiu em aproximadamente 90 % em cada mês de estocagem.

Jiang et al. (2017) fornecendo diferentes doses de leveduras vivas e uma dose alta de leveduras mortas para avaliar o efeito de dose e viabilidade, encontraram respostas diferentes para a população ruminal de bactérias. A adição de baixa quantidade de levedura viva aumentou a abundância de bactérias celulolíticas (*Ruminococcus* e *F. succinogenes*) quando comparado à suplementação de leveduras mortas. A adição de grande quantidade de leveduras mortas favoreceu o aumento de bactérias amilolíticas (*Ruminobacter* e *Bifidobacteria*). A maioria das famílias de bactérias que tiveram resposta com a adição de baixa quantidade de levedura viva fazem parte de famílias com menos informações a respeito do modo de ação das leveduras (*Paraprevotellaceae*, CF231, *Treponema* e *Lechnospiraceae*).

Diferenças entre cepas de *S. cerevisiae* atuando na modificação da população ruminal, foram encontradas por Newbold et al. (1995). Foram avaliados os efeitos de diferentes cepas (NCYC 240, NCYC 694, NCYC 1026, NCYC 1088) e de um produto comercial contendo *S. cerevisiae* (Yea-Sacc) no número de bactérias ruminais *in vitro* e *in vivo*. As cepas NCYC 240, NCYC 1026 e Yea-Sacc foram capazes de estimular *in vitro* o número de bactérias total e celulolíticas, enquanto que NCYC 694 e NCYC 1088 não teve efeito no número de bactérias. As cepas NCYC 240, NCYC 1026 e Yea-Sacc foram testadas *in vivo* em carneiros canulados ruminalmente e somente a cepa NCYC 1026 aumentou o número total de bactérias e a cepa NCYC 240 aumentou bactérias celulolíticas.

As diferentes cepas de leveduras e os diferentes produtos a base de parede celular de levedura podem apresentar diferenças no mecanismo de ação. Com o objetivo de caracterizar a ligação de leveduras e seus produtos nas bactérias patogênicas gram-

positivas ou gram-negativas, Posadas et al. (2017) testaram dois diferentes tipos de leveduras vivas e três produtos de parede celular de levedura com 13 bactérias de diferentes cepas através de um escaneamento por microscopia eletrônica e ensaios com filtragens. Verificaram respostas diferentes para as leveduras. As leveduras vivas ($P < 0,05$) apresentaram maior adesão às bactérias do que os produtos à base de leveduras. *Escherichia coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* tiveram menor potencial de ligação às leveduras e produtos. *Clostridium perfringens* apresentaram capacidade de ligação para todos os produtos. Foram avaliados também a habilidade de *Salmonella* e *Listeria* em utilizar os componentes de leveduras como nutrientes. As bactérias foram cultivadas em meio com carbono limitado e suplementadas com extratos de leveduras e de parede celular de levedura. Foi observado crescimento da *Salmonella*, indicando que ela pode utilizar fragmento de levedura como fonte de carbono. *Listeria monocytogenes* apresentou crescimento limitado em apenas um dos extratos. Concluíram que o mecanismo de ação dos probióticos e produtos à base de leveduras depende da cepa. Assim, a utilização de probióticos e produtos derivados de probióticos como tratamento de doenças, deve ser específico contra o patógeno alvo.

2.3.1 Mecanismo de ação das Leveduras

2.3.1.1 Ação ruminal

Segundo Chaucheyras et al. (1996), algumas cepas de *S. cerevisiae* podem ser mais eficientes na utilização de açúcares que a *Streptococcus bovis*, diminuindo assim a produção de ácido lático. Fatores estimulatórios como a absorção do oxigênio que entra no ambiente ruminal pela saliva e aderido às partículas de alimento e o fornecimento de ácidos dicarboxílicos, sobretudo o ácido málico, que são utilizados pelas bactérias consumidoras de ácido lático, são atribuídos às leveduras que propiciam uma melhora do ambiente ruminal, devido às menores flutuações do pH (MARTIN; NISBET, 1992).

A metabolização do lactato pelas bactérias tem sido atribuída como efeito da suplementação de leveduras vivas. Chaucheyras et al. (1996) observaram, *in vitro*, que a *S. cerevisiae* (Levucell SC) foi capaz de competir com a *S. bovis* pela utilização de açúcares, diminuindo a quantidade de substrato disponível para o crescimento bacteriano, o que limitou a quantidade de lactato produzido. A presença de leveduras

vivas estimulou o crescimento de bactérias consumidoras de lactato como a *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, por fornecerem diferentes fatores de crescimento como aminoácidos, peptídeos, vitaminas e ácidos orgânicos (NISBET; MARTIN, 1991; CHAUCHEYRAS et al., 1996; NEWBOLD et al. 1998; ROSSI et al., 2004).

A estabilização do pH é outro efeito atribuído às leveduras, de acordo com Brossard et al. (2004). *S. cerevisiae* estimulou o crescimento de protozoários ciliados, os quais são conhecidos por sua capacidade de engolfar rapidamente os grânulos de amido e assim competirem efetivamente com as bactérias amilolíticas pelo substrato. Além disso, os protozoários fermentam o amido numa velocidade menor que as bactérias amilolíticas favorecendo menores flutuações no pH (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2012).

2.3.1.2 Consumo de matéria seca e resposta animal

A suplementação de leveduras na dieta de vacas leiteiras podem apresentar respostas diferentes no consumo e produção de leite. Uma interação entre o tipo de forragem da dieta e a suplementação com levedura foi verificado por Adams et al. (1995), onde a dieta com volumoso de melhor qualidade (alfafa) proporcionou maiores produções de leite. Os efeitos da suplementação de leveduras no consumo de matéria seca (CMS), parâmetros ruminais (pH, concentração de AGV e ácido lático, relação acetato:propionato) e digestibilidade da matéria orgânica em ruminantes leiteiros e de corte foram retratados em uma meta-análise que envolveu experimentos com suplementação de *S. cerevisiae* (DESNOYERS et al.; 2009). Analisaram também se o consumo, a composição da dieta podem ter influência sobre as leveduras e em quais circunstâncias as leveduras são mais eficientes. A meta-análise incluiu experimentos *in vivo* de grandes e pequenos ruminantes. Observaram que a suplementação com leveduras aumentou o CMS ($P = 0.044$) e a produção de leite ($P < 0,001$), com tendência em aumentar o conteúdo de gordura do leite ($P = 0,007$). O efeito positivo no CMS aumentou com a proporção de concentrado na dieta ($P = 0,043$), mas não teve influência da FDN e da PB. A produção de leite aumentou com o CMS ($P < 0,001$) e com a proporção de concentrado ($P < 0,001$), FDN ($P = 0,001$) e PB ($P = 0,001$) da dieta.

De Ondarza et al. (2010) compilaram dados de experimentos com vacas leiteiras avaliando a suplementação de leveduras vivas (*S. cerevisiae*) no CMS e produção e composição do leite. Um aumento de 1,15 kg/dia ($P < 0,01$) foi observado na produção de leite. A suplementação com levedura não alterou o CMS ($P = 0,13$). O conteúdo de gordura do leite foi um pouco menor para os animais que receberam levedura em relação ao controle (3,75 vs. 3,80%; $P = 0,03$). Entretanto a produção de gordura foi maior para os animais suplementados (1,28 vs. 1,25 kg/ dia; $P = 0,01$). O conteúdo de proteína do leite também reduziu com a adição de levedura (2,99 vs. 3,03%; $P = 0,001$), entretanto, com a alta produção de leite a produção de proteína foi maior com a suplementação de levedura (1,02 vs. 1,00 kg/dia; $P < 0,0001$).

Poppy et al. (2012) reuniu estudos apenas com a suplementação de cultura de leveduras. Observaram um aumento de 1,2 kg ($P < 0,001$) na produção de leite e um aumento no CMS em 0,62 kg/ dia ($P < 0,01$) para vacas em início de lactação. A suplementação com cultura de levedura para vacas leiteiras em condições de estresse calórico foi realizada por Bruno et al. (2009). Suplementaram 30 g/ dia de cultura de leveduras e não encontraram diferenças no CMS, entretanto aumentou o leite em 1,2 kg/d ($P = 0,02$), mas reduziu o teor de gordura em 0,10% ($P = 0,001$).

A suplementação com leveduras nem sempre está relacionada com efeitos positivos na produção de leite. Swartz et al. (1994) avaliaram o fornecimento de dois produtos de leveduras em rebanhos de fazendas comerciais e não obtiveram resultados positivos no desempenho lactacional. Os resultados foram atribuídos ao uso de tamponantes que podem ter mascarado o efeito da levedura e à composição e qualidade das dietas que foram diferentes. O fornecimento de 0, 2 ou 4 g/dia de leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Procreatin-7, Lesaffre) em dieta com alto amido não alterou a produção de leite ($P > 0,10$). Os resultados foram atribuídos às proporções molares semelhantes de acetato e propionato entre as dietas (FERRARETO et al. (2012).

A utilização de leveduras pode alterar também o comportamento ingestivo dos animais. Bach et al. (2007) utilizando leveduras vivas na suplementação de vacas em lactação, obtiveram aumentos nas medias de pH ruminal. As vacas suplementadas com leveduras tiveram um menor intervalo entre as refeições e conseqüentemente maior número de refeições do que as vacas não suplementadas. O aumento das médias de pH ruminal não foram atribuídas às mudanças no comportamento ingestivo, entretanto a

frequência de alimentação é um efeito benéfico da levedura que deve ser considerado para tentar solucionar os mecanismos envolvidos na redução de acidose.

2.3.1.3 Digestão da fibra

A ação dos probióticos em melhorar a digestibilidade da fibra pode ser decorrente de efeitos diretos e indiretos no ambiente ruminal. Os efeitos indiretos podem ser relacionados aos efeitos de estabilização do pH ou pela alteração no ambiente da microbiota que sustenta ou promove a degradação da fibra. O efeito direto nos microrganismos fibrolíticos se dá pelo fornecimento de nutrientes para as bactérias e fungos, tais como peptídeos, aminoácidos, amônia, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia ramificada através do uso dos probióticos (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2012).

A suplementação com leveduras pode estimular o crescimento de bactérias fibrolíticas. Callaway e Martin (1997), em um experimento *in vitro* com o objetivo de determinar os efeitos da cultura de levedura na utilização de lactato e digestão da celulose por bactérias ruminais, encontraram que a cultura de levedura pode acelerar a taxa, mas não a extensão do papel de degradação da celulose pela *F. succinogenes* S85 e *R. flavefaciens* FD1, sugerindo que a cultura de levedura forneceu compostos que possibilitaram o crescimento de bactérias ruminais que utilizam o lactato e digerem celulose.

O benefício na digestão da fibra pode ser atribuído ao frequente aumento no CMS com a suplementação de leveduras, melhorando a saúde ruminal e sua função pela melhora na eficiência alimentar (JOUANY, 2006). Ferrareto et al. (2012) encontraram aumento na digestibilidade da fibra em dieta com alto amido fornecendo 0, 2 ou 4 g/dia de leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Procreatin-7, Lesaffre). Observaram uma maior digestibilidade da FDN para a dose de 4 g/dia, entretanto não foi verificada diferença no pH ruminal entre os tratamentos. Efeito semelhante foi encontrado por Bitencourt et al. (2011) que não encontrou diferenças no pH para o tratamento com leveduras vivas (*S. cerevisiae*, CNCM I-1077), mas observou uma tendência em aumentar a digestibilidade da FDN. Esses experimentos sugerem que o aumento da digestibilidade favorecida pela suplementação com leveduras pode ser um fator independente das flutuações de pH ruminal.

2.3.1.4 Mecanismo de ação na temperatura corporal

Huber et al. (1994) relacionaram que a suplementação com cultura de fungos (cepas de *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*) pode atenuar a temperatura corporal, temperatura retal em condições de estresse térmico, melhorando a produção e composição do leite de vacas em lactação. As pesquisas iniciais foram realizadas com cultura de *A. oryzae*, entretanto, os efeitos também são observados para culturas de leveduras (HUBER, 1990; WILLIANS; NEWBOLD, 1990).

O mecanismo pelo qual o fornecimento de cultura de fungos diminui a temperatura retal e a frequência respiratória em vacas sob condições de estresse calórico não é totalmente esclarecido (HUBER et al., 1994). Bruno et al. (2009) observaram que o fornecimento de 30 g/dia de cultura de *S. cerevisiae* alterou a temperatura retal de vacas sob condições de estresse calórico, entretanto obteve apenas um pequeno resultado numérico (38,52° vs. 38,44°C). Finck et al. (2014) avaliaram a suplementação de levedura em novilhas cruzadas desmamadas e realizaram um desafio fornecendo lipopolissacarídeo (LPS). Compararam a utilização de levedura viva (10^{10} ufc/g; 5 g /d por animal), parede celular de leveduras (5 g/d por animal e levedura viva + parede celular de levedura (5 g/dia de levedura viva + 5 g/dia de parede celular de levedura por animal). A temperatura retal foi reduzida ($P \leq 0,01$) no tratamento com levedura viva + cultura de levedura e no tratamento com levedura viva ($P \leq 0,04$) quando comparada ao tratamento controle antes do desafio. Após o desafio foi observado aumento da temperatura sendo que as novilhas do tratamento controle permaneceram com a temperatura retal mais elevada ($P < 0,05$) que nos demais tratamentos com leveduras. Salvati et al. (2015) suplementaram uma dose diária de 10 gramas de leveduras vivas (cepa NCYC) para vacas leiteiras no verão que favoreceu uma queda da temperatura retal e da pele e, das taxas de respiração que foi atribuída ao aumento da concentração plasmática de niacina. Dias et al. (2018) observaram um aumento de 0.16 µg/mL de niacina no plasma em relação ao tratamento controle suplementando cultura de leveduras para vacas leiteiras. Houve redução na temperatura da pele e a temperatura retal reduziu às 15 horas ($P < 0,01$). A taxa respiratória reduziu às 7 h 30 e 15 h ($P < 0,04$) e tendeu a reduzir às 20 h.

A niacina ou ácido nicotínico (vitamina B₃), uma vitamina que funciona como uma coenzima nos processos de oxirredução, sendo precursora de NAD e NADP, com um importante papel na respiração mitocondrial e no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos (NRC, 2001), desencadeia reações vasodilatadoras que podem ser benéficas para vacas sob condições de estresse calórico (DI CONSTANZO et al., 1997). A niacina induz a liberação de prostaglandina D (PGD₂) pelas células de Langerhans e essa liberação de PGD₂ ativa as células vasculares que ocasiona uma vasodilatação cutânea (MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 2006).

A niacina ruminal pode ser sintetizada a partir do aminoácido triptofano (MAYES, 1993). A síntese ruminal de niacina, segundo o NRC (2001), é adequada para atender as exigências do animal sob condições normais. Entretanto, em alguns animais a suplementação com niacina pode aumentar a produção de leite (FRENCH, 2004).

A absorção de niacina ocorre no intestino delgado, cerca de 60 a 80% da niacina que entra no duodeno é absorvida pelo intestino (MILLER et al., 1986). No rúmen pode ocorrer absorção direta pela parede ruminal, entretanto é muito limitada, pois apenas uma pequena fração das vitaminas está no sobrenadante do fluido ruminal (3 a 7%), a maior parte encontra-se aderida aos microrganismos ruminais e sofrem degradação (ERICKSON et al., 1991).

O efeito da suplementação de ácido nicotínico (AN) em doses crescentes em 3 períodos consecutivos de 17 dias (período 1 = 12 g/d, período 2 = 24 g/d e período 3 = 36 g/d) foi avaliado por Di Constanzo et al. (1997) para melhorar as respostas termorregulatórias em vacas holandesas em lactação durante o verão. Temperatura e taxa respiratória foram mensuradas duas vezes ao dia (8 e 16 h) no período 1, três vezes nos períodos 2 e 3 (8, 16 e 22 h). O período 1 foi caracterizado como período de estresse moderado com temperatura média de 28,5 °C, o período 2 como estresse severo com temperatura média de 31,4 °C e o período 3 foi caracterizado sem condições de estresse. No período 1, a temperatura retal não foi afetada pelo tratamento às 8 e 16 h. A temperatura da garupa foi menor às 8 e 16 h para as vacas suplementadas com AN. A frequência respiratória não foi alterada. No período 2 a temperatura retal às 8, 16 e 22 h não foram afetadas pelos tratamentos. A temperatura da cauda às 8 h foi menor para as vacas suplementadas com AN do que para o controle. Semelhantemente, às 16 e 22 h a temperatura da cauda tendeu a diminuir com o tratamento. A temperatura da garupa às

08 horas também tendeu a diminuir com o tratamento. Entretanto às 16 e 22 h não tiveram diferença entre os tratamentos. A frequência respiratória teve uma queda numérica com a suplementação nos 3 horários. No período 3 a temperatura retal, a temperatura da cauda, a temperatura da garupa e frequência respiratória não tiveram diferença estatística entre os tratamentos. A suplementação com ácido nicotínico em condições de estresse moderado à severo não afetou a temperatura retal, mas a temperatura da pele como uma medida de transferência de calor foi reduzida no estresse moderado. A tendência em reduzir a frequência respiratória e a temperatura da garupa durante condições de estresse severo e a falta de resposta durante condições termoneutras suportam um efeito positivo da suplementação de ácido nicotínico em vacas submetidas à estresse térmico no verão.

Zimbelman et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de determinar se a suplementação de 12 gramas por dia de niacina encapsulada aumentariam a niacina livre no plasma de vacas em lactação e se a niacina seria capaz de alterar perda de calor evaporativo e da temperatura corporal em vacas sob condições de temperatura termoneutra (7 dias) e de estresse calórico (7 dias). Suplementaram com 0 ou 12 g/d de produto de niacina encapsulada, que fornecia 7,8 g de niacina por dia por vaca. As concentrações de niacina no plasma nas condições termoneutras foram maiores ($P < 0,03$) nas vacas suplementadas com niacina e permaneceram altas ($P < 0,03$) em condições de estresse térmico. A produção de leite não foi afetada pelos tratamentos. O CMS diminuiu ($P < 0,05$) durante o período de estresse térmico para o controle e tratamento com niacina. O consumo de água aumentou em todos os tratamentos no período de estresse térmico. A perda de calor por evaporação foi maior ($P < 0,01$) nas vacas suplementadas no período de estresse térmico quando comparado ao termoneutro. A temperatura retal diminuiu (38,17 vs. 38,34 °C), assim como a temperatura vaginal (38,0 vs. 38,4 °C) para as vacas suplementadas com niacina em estresse térmico quando comparadas ao controle.

O fornecimento de niacina protegida para vacas leiteiras com o objetivo de ser absorvida no intestino e aliviar os efeitos do estresse calórico foi avaliado em dois experimentos, sendo que o primeiro para vacas em início de lactação ($53 \pm 5,5$ DEL) e o segundo para vacas no meio da lactação ($188 \pm 4,4$ DEL) por Wrinkle et al. (2012). As taxas respiratórias e escore de ofegação foram medidos quatro vezes ao dia. No

experimento 1 observaram que a taxa respiratória foi menor ($P = 0,02$) apenas às 09 horas, sem efeito nos outros horários e o escore de ofegação foi menor ($P \leq 0,01$) às 04:30, 09:00 e 20:30 horas, mas não teve efeito às 16:30 horas para o tratamento com suplementação de niacina. Não observaram diferenças no CMS e na produção de leite, mas a proporção de gordura do leite foi menor ($P < 0,01$) nas vacas recebendo niacina. No experimento 2, o CMS e a produção de leite não tiveram diferença entre os tratamentos, entretanto a proporção de gordura foi maior ($P < 0,01$) para as vacas recebendo niacina protegida. Destacaram então, que a resposta da niacina no conforto dos animais em relação ao estresse térmico não teve efeito no CMS e na produção de leite.

Castagnino et al. (2016) avaliaram o tamanho de partícula de silagem na síntese ruminal e o suprimento de vitaminas B pós-ruminal de vacas em lactação. Foram realizados dois ensaios: silagem de alfafa (ensaio 1) e silagem de capim dos pomares (ensaio 2) com dois comprimentos de partícula, longo com 19 mm ou curto com 10 mm. Foram medidos na dieta e no conteúdo duodenal: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, folatos e vitamina B 12. A síntese ruminal diária foi calculada como o fluxo duodenal menos o ingerido. No ensaio 1, a dieta com partículas longas aumentou a ingestão de todas as vitaminas. No ensaio 2, o tamanho de partícula diminuiu a ingestão de vitaminas, aumentou a síntese ruminal de niacina. A síntese ruminal diária de niacina foi correlacionada negativamente com a sua ingestão, sugerindo que as bactérias ruminais reduziram sua síntese quando foi fornecida na dieta. Atividade microbiana pode ter também reduzido a degradação de niacina, que é suportada pela correlação negativa entre a síntese ruminal dessa vitamina e a ingestão de nutrientes, pH ruminal, taxa de passagem, FDN indigestível no rúmen e fluxo duodenal de N microbiano, mas, correlação positiva com o FDN digestível no rúmen e concentração de AGV. Sugerindo que maiores ingestões de nutrientes e fluxo duodenal, assim como maior digestão de FDN no rúmen, aumenta a degradação de niacina pelas bactérias ruminais.

Doses crescentes de niacina protegida (0, 4, 8 e 12 g/d) foram suplementadas por Rungruang et al. (2014) para 24 vacas holandesas de alta produção submetidas a dois ambientes, TN e EC . A temperatura retal, vaginal, frequência respiratória e taxa de sudorese não tiveram efeito com a suplementação. A suplementação com niacina protegida aumentou de forma linear ($P < 0,01$) as concentrações de niacina plasmáticas.

No ambiente EC as concentrações de niacina no plasma foram menores que no ambiente TN. Assim, provavelmente o ambiente altera o metabolismo de niacina durante o estresse térmico, podendo levar a um aumento da mobilização da niacina estocada nas hemáceas. A concentração de niacina do leite também teve um efeito linear com as doses, entretanto não teve efeito do ambiente.

2.3.2 Leveduras como probióticos e imunomodulação

As leveduras estão incluídas nos microrganismos que são utilizados como probióticos. A definição mais utilizada para probióticos é que são: “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício para a saúde do hospedeiro” (FULLER, 1989). Entretanto, o termo probiótico vem sendo substituído pelo termo DFM “direct-fed microbials”, como produto alimentar contendo fonte natural de microrganismos vivos (viáveis) por indicação da Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. A maioria dos microrganismos usados como probióticos são bactérias, seguidos de fungos e leveduras (FAO, 2016).

Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos no intestino incluem três principais vias: extinção dos patógenos através da produção de substâncias antimicrobianas, competição por nutrientes e competição dos locais de adesão; alteração do metabolismo microbiano através do aumento ou diminuição da atividade enzimática e modulação da resposta imune através do aumento dos níveis de anticorpos e aumento da atividade dos macrófagos (FULLER, 1989; FAO/WHO, 2001; RAUTRAY et al., 2011). Os probióticos podem aumentar a população de microrganismos benéficos (lactobacilos e bifidobactérias) que através da produção de substâncias inibidoras como bacteriocinas e/ou ácidos orgânicos, ou por exclusão competitiva, inibem o crescimento de microrganismos prejudiciais no trato gastrointestinal (FAO, 2016).

A utilização de substâncias imunomoduladoras na nutrição animal tem como objetivo favorecer respostas para imunidade inata e adquirida (GALLOIS; OSWALD, 2008). Essas respostas aumentam a resistência do hospedeiro contra ataques de patógenos através de uma melhora nas reações imunes protetoras em locais vulneráveis como nas glândulas mamárias em bovinos de leite, atenuando os efeitos imunossupressivos do estresse e poluição ambiental, modulam para uma resposta especializada mais adequada e podem ainda aumentar a intensidade e duração da

resposta imune após a vacinação, mantendo a vigilância imunológica (DHAMA et al., 2015).

A imunomodulação pode ser específica ou não específica. A imunomodulação específica é limitada a um único antígeno como, por exemplo, no processo de imunização ativa artificial (vacinação). A imunomodulação não-específica resulta numa mudança na capacidade da resposta imune, tanto na inata quanto na adaptativa, sistêmica ou de mucosas, levando a uma alteração na reação do hospedeiro para antígenos diferentes (DHAMA et al., 2015).

Os probióticos são conhecidos pelo seu potencial na ativação não específica de macrófagos e estimulação da atividade das células natural killer. Uma grande variedade de microrganismos tem sido empregados como imunoestimulantes, já que a maioria dos componentes celulares atuam como ligantes para diferentes receptores TLR. Como resultado ativam, por exemplo, macrófagos e células dendríticas que por sua vez estimulam a liberação de uma variedade de citocinas (DHAMA et al., 2015).

Leveduras vivas foram descritas como sendo capazes de proteger a mucosa intestinal contra microrganismos invasores por terem ação antipatogênica e por contribuir no estímulo e maturação da resposta imune no hospedeiro (FULLER, 1989). As leveduras que chegam ao intestino, escapando da degradação ruminal, digestão no abomaso podem ter uma atividade imunoestimulatória (DURAND-CHAUCHEYRAS et al., 1998; MORAN, 2004).

A parede celular de *S. cerevisiae* é composta em sua maioria por polissacarídeos, com aproximadamente 30-50 % de manoproteínas, 5-10 % de β -1,6-glucanos, 30-45% de β -1,3-glucanos e 1,5-6 % de quitinas (KLIS et al., 2006). Os β -glucanos podem ser definidos como fibra indigestível da dieta (KIM et al., 2006) e tem sido considerados como estimuladores da resposta imune, por aumentarem o número de células fagocíticas como os macrófagos. As leveduras autolizadas tem sido utilizadas por possuírem efeitos benéficos como compostos imunomoduladores que interagem direta e indiretamente tanto com os patógenos quanto com os componentes do sistema imune do animal (KOGAN; KOCHER, 2007).

Dogi et al. (2011) utilizaram cepas de leveduras isoladas e selecionadas por sua capacidade de ligação com aflatoxina B₁ e habilidade anti-patogênica, sendo duas cepas, RC008 e RC009, isoladas de silagem de milho e uma RC016 do intestino de suíno. As

cepas de leveduras foram incubadas *in vitro* sob condições simuladas do trato gastrointestinal, em diferentes pH. As cepas RC008 e RC016 foram capazes de sobreviver e se ligar à aflatoxina B1 sob condições do trato gastrointestinal e assim, exercerem efeitos benéficos no hospedeiro.

O uso de leveduras como imunomoduladores pode minimizar as perdas da produção de leite favorecendo a saúde animal. Efeito da utilização de levedura na redução da contagem de células somáticas (CCS) tem sido observado. Oliveira et al. (2010) suplementaram vacas em lactação com 10 gramas por dia de produto de levedura viva (*S. cerevisiae*) por 28 dias e observaram redução na CCS ($P = 0,02$) que foi atribuído à um efeito da levedura sobre o sistema imunológico. Zaworski et al. (2014) forneceram 0, 56 e 112 g de produto derivado da fermentação de *S. cerevisiae* (SCFP) para vacas em transição no período de 28 dias antes do parto até 28 dias após o parto. Houve um aumento da produção de leite em $5,2 \pm 2,3$ kg/dia ($P = 0,03$) nas primeiras quatro semanas após o parto com a suplementação de SCFP não tendo efeito de dose. A composição do leite não foi significativamente afetada pela suplementação de SCFP, exceto para a CCS que tiveram um decréscimo independentemente da dose (162 vs. 75 vs. 88 mil / μ L para 0, 56 e 112 g de SCFP). Observaram que a suplementação de SCFP durante o período de transição pode afetar o metabolismo e estado imunológico de vacas no início da lactação. A suplementação teve um efeito benéfico na produção de leite e queda da CCS independente da dose fornecida. A suplementação com 25 gramas por dia de produto de levedura viva (*S. cerevisiae*) por 12 semanas baixou a CCS de vacas em lactação ($P < 0,01$), a qual foi atribuída à melhora na qualidade do leite (TRISTAN; MORAN, 2015). Redução na CCS de búfalas leiteiras foi relatada com o fornecimento de 30 gramas por dia de *S. cerevisiae*, entretanto os autores relataram que o resultado precisava ser melhor investigado (DEGIRMENCIOGLU et al., 2013).

Bach et al. (2018) extraíram o RNA total dos tecidos ruminal e do cólon para verificar as mudanças na expressão gênica nos epitélios ruminal e do cólon de vacas leiteiras suplementadas com leveduras vivas. As mudanças na expressão gênica foram verificadas nos dois tecidos. Essas respostas indicam que as leveduras vivas podem ter tanto uma ação ruminal, quanto uma ação imunomodulatória através das leveduras que chegaram ao intestino.

O efeito da suplementação de dois produtos de parede celular de levedura (*S. cerevisiae*) nas respostas fisiológica e aguda de novilhas de corte cruzadas após desafio com LPS foi avaliado por Burdick Sanchez et al. (2013a) Os tratamentos foram: controle, produto A de parede celular de levedura (YCW-A; 2,5 g/novilha/dia), produto C de parede celular de levedura (YCW-C; 2,5 g/novilha/dia). Após o desafio com LPS houve um aumento na temperatura vaginal sendo que no tratamento controle e YCW-A a temperatura foi maior que no tratamento YCW-C (39,00; 38,99 vs. 38,90; $P < 0,01$). As concentrações de cortisol foram maiores no controle do que nos tratamentos com levedura. As concentrações de INF-gama e TNF-alfa aumentaram após o desafio, mas não foram afetadas pelo tratamento YCW. IL-6 aumentou após o desafio ($P < 0,001$) e o controle foi maior (35,1 pg/ml) que nos YCW-A (85,8 pg/ml) e YCW-C (136,2 pg/ml; $P < 0,001$). A suplementação com YCW pode melhorar a saúde de novilhas através da redução das respostas fisiológicas e agudas após o desafio com endotoxina (LPS).

As respostas metabólicas foram também avaliadas (BURDICK SANCHEZ et al., 2013b). O ganho de peso aumentou mas não teve efeito dos tratamentos ($P < 0,001$). A glicose aumentou após o desafio ($P < 0,001$) e foram menores para YCW-A que o controle e YCW-C. A insulina antes do desafio foi maior nos tratamentos YCW-A e YCW-C que no controle. Após o desafio a insulina foi maior para o tratamento YCW-C (0,95 ng/ml) que no tratamento YCW-A (0,71 ng/ml) e controle (0,59 ng/ml). Os AGNE tenderam ser menores no YCW-C que no controle antes do desafio ($P = 0,073$). Após o desafio foram menores para YCW-C (0,176 mmol/l) que o controle (0,211 mmol/l) e YCW-A (0,206 mmol/l). O nitrogênio ureico do sangue foi maior no YCW-A (8,9 mg/dl; $P < 0,001$) que no controle (8,2 mg/dl) e YCW-C (8,1 mg/dl) após o desafio. De acordo com os resultados, a suplementação de YCW podem aumentar o metabolismo energético durante o desafio, sem ocasionar lipólise ou catabolismo. Assim, a utilização de YCW durante o desafio imune podem modular a demanda de energia e permitir um retorno apropriado à homeostase.

Yuan et al. (2015), com o objetivo de avaliar a suplementação de produto derivado de *S. cerevisiae* na imunidade e inflamação uterina de vacas na transição, utilizaram produto contendo cultura de levedura mais levedura hidrolisada enzimaticamente (YC-EHY; Celmanax, Vi-COR, Mason City, IA) com doses de 0, 30, 60 e 90 g/dia ao longo do experimento. Foi realizado um desafio com injeções

subcutâneas de ovoalbumina para avaliar a resposta humoral nos dias -21, -7 e 14. Observaram que as concentrações de IgG no colostro não foram afetadas pelos tratamentos. Não houve efeito dos tratamentos nas contagens de eritrócitos, hemoglobina e leucócitos. O hematócrito diminuiu linearmente com o tratamento. As plaquetas aumentaram com YC-EHY quando comparados ao controle. As concentrações de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos não foram afetados pelos tratamentos. As concentrações de neutrófilos diminuíram com a suplementação. A hemoglobina, hematócrito e eritrócito diminuíram nos dias 21 e 35 quando comparados com outras datas. Os leucócitos aumentaram no dia 1 após o parto. As plaquetas diminuíram na semana do parto quando comparadas com o dia -21 e aumentaram no dia 21 e dia 35. A concentração e proporção de neutrófilos aumentaram no parto. A concentração de linfócitos foi maior no dia -21 quando comparada com outras datas, os monócitos aumentaram após o parto quando comparados ao pré-parto e os eosinófilos diminuíram no pós-parto em relação ao pré-parto. O aumento da dose de YC-EHY aumentou os níveis de IgG anti-ovoalbumina após três desafios de ovoalbumina, sugerindo que os tratamentos aumentaram a imunidade humoral. Com o aumento da dose de YC-EHY aumentou quadraticamente a concentração fecal de IgA no início da lactação, sugerindo que doses de 30 e 60 g/dia podem melhorar a imunidade de mucosa. A população de neutrófilos foi maior no dia 7 comparada ao dia 42, refletindo a infiltração de neutrófilos imediatamente após o parto, mas não houve efeito do tratamento. A mieloperoxidase (MPO) e neutrófilo elastase (ELANE) foram maiores no dia 7 comparado ao 42, compatível com o aumento da população de neutrófilos. A suplementação de YC-EHY de 30 e 60 g/dia diminuíram IL-6 RNAm, enquanto MPO e ELANE aumentaram com os tratamentos. Embora o produto de levedura tenha exercido efeitos inconsistentes, os resultados encontrados indicam que os componentes de levedura podem modular a inflamação e possivelmente a função reprodutiva. Observaram uma tendência para um efeito quadrático de dose para a semana 1 semana 5 de lactação, refletindo numa queda da CCS na dose de 30 e 60 g/dia. Os resultados sugerem que o produto de levedura pode melhorar as medidas de defesa humoral e da imunidade celular de mucosas, e ainda modular a saúde da glândula mamária no início da lactação.

Efeito imunomodulatório tem sido observado com o fornecimento do produto Omnigen-AF® (Phibro Animal Health, Teaneck, NJ) que contém uma mistura de compostos, dentre eles levedura (*Sacharomyces cerevisiae*) e niacina. O fornecimento de 56 gramas/ vaca/ dia de Omnigen-AF® (OMN) ou não foi avaliado por Brandao et al. (2016) para vacas em transição com início aos 35 dias anteriores ao parto previsto e por 46 dias após o parto com o objetivo de otimizar a resposta metabólica e imune inata no período de transição para aumentar a produção de leite. Aumento na produção de leite e melhora na resposta imune inata foram observados com o tratamento de OMN, com aumento de neutrófilos no endométrio, aumento do fator de necrose tumoral (TNF- α) e haptoglobina após o desafio com LPS. O fornecimento de OMN e placebo foi também avaliado por Fabris et al. (2017) que compararam vacas no pré parto em duas condições, resfriadas ou sob estresse térmico e após o parto (60 dias) manteve os tratamentos sob condições de resfriamento. As vacas suplementadas com OMN apresentaram menor frequência respiratória em condições de estresse térmico e maior produção de leite. O incremento da produção de leite foi atribuído à suplementação de OMN que atua como um imunomodulador contribuindo com a função imune durante o período de estresse térmico.

3 REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2044-2050, 1994.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Immunology**, v. 8, p. 411-420, 2008.

BACH, A. et al. Changes in gene expression in the rumen and colon epithelia during the dry period through lactation of dairy cows and effects of live yeast supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 2631-2640, 2018.

BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**. v.136, p. 156-163, 2007.

BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Ruminant production and metabolic responses to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1855-1865, 2012.

BAUMGARD; L. H.; RHOADS, R. P. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetic. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 311-337, 2013.

BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, p. 1167-1183, 2010.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845-859, 2004.

BITENCOURT, L. L. et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 301-307, May/Jun. 2011.

BRANDÃO, A. P. et al. Physiologic, health, and production responses of dairy cows supplemented with na immunomodulatory feed ingrediente during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 5562-5572, 2016.

BRANDTZAEG, P. Gate-keeper function of the intestinal epithelium. **Beneficial Microbes**, v. 4, p. 67-82, 2013.

BROSSARD, L. et al. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. **Reproduction Nutrition Development**. v. 44, p. 195-206, 2004.

BRUNO, R. G. S. et al. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, p. 175–186, 2009.

BURDICK SANCHEZ, N. C. et al. Yeast cell wall supplementation alters aspects of the physiological and acute phase responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge. **Innate Immunity**, v. 19, p. 411-419, 2013a.

BURDICK SANCHEZ, N. C. et al. Yeast cell wall supplementation alters the metabolic responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge. **Innate Immunity**, v.20, p. 104-112, 2013b.

CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2035-2044, 1997.

CARROL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, p. 105-149, 2007.

CARROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptative immunity. **Nature Immunology**, v. 5, p. 981-986, 2004.

CASTAGNINO, D. S. et al. Particle length of silages affects apparent ruminal synthesis of B vitamins in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6229-6236, 2016.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S3-23, 2010.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p. 927-933, 1996.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. **In: InTech - Probiotic in animals**, p. 119-152, 2012.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v.145, n.1, p.5–26, Aug. 2008.

COLLIER, R. J. et al. Invited review: Genes involved in the Bovine heat stress response. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 445-454, 2008.

COLLIER, R. J. et al. Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. **In: 23 Annual Ruminant Nutrient Symposium**, 2012.

COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 435-446, 2008.

DAVENPORT, H.W. **The ABC of Acid-Base Chemistry: The Elements of Physiological Blood-Gas Chemistry for Medical Students and Physicians**. 6 ed. Chicago: University of Chicago Press, 1974.

DE ONDARZA, M. B. et al. Case study: Multiple study analysis of the effect of live yeast on Milk yield, Milk component content and yield and feed efficiency. **The Professional Animal Scientist**, v. 26, p. 661-666, 2010.

DEGIRMENCIOGLU, T. et al. Effects of yeast culture addition (*Saccharomyces cerevisiae*) to Anatolian water buffalo diets on milk composition and somatic cell count. **Mljekarstvo**, v. 63, p. 42-48, 2013.

DESNOYERS, M. et al. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1620-1632, 2009.

DHAMA, K. et al. Effect of immunomodulation and immunomodulatory agents on health with some bioactive principles, modes of action and potent biomedical applications. **International Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 253-290, 2015.

DI COSTANZO, A.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E. Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1200-1206, 1997.

DIAS, J. D. L. et al. Yeast culture increased plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and feed efficiency of dairy cows in a hot environment. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 5924-5936, 2018.

DOGI, C. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, p. 1705-1711, 2011.

DURAND-CHAUCHEYRAS, F. et al. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, p. 275-280, 1998.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 23-27, 2010.

ERICKSON, P. S. et al. Niacin absorption from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3492-3495, 1991.

FABRIS, T. F. et al. Effect of nutritional immunomodulation and heat stress during the dry period on subsequent performance of cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 6733-6742, 2017.

FAO. 2016. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. **FAO Animal Production and Health**, Paper 179.

FAO/WHO 2001. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; BERTICS, S. J. Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 4017-4028, 2012.

FINCK, D. N. et al. Yeast supplementation alters the performance and health status of receiving cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, p. 333-341, 2014.

FRENCH, P. D. Nicotinic acid supplemented at a therapeutic level minimizes prepartum feed intake depression in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 347, 2004.

FULLER R. A review: Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GALLOIS, M.; OSWALD, I. P. Immunomodulators as efficient alternatives to in-feed antimicrobials in pig production? **Archiva Zootechnica**, v. 11, p. 15-32, 2008.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**. v.11, p. 545-553, 2005.

HUBER, J. T. The fungal and yeast story in lactating dairy cows. **In: Proceedings of the Southwest Nutrition and Management Conference**, Dep. Anim. Sci., Univ. Arizona, Tucson, p. 87, 1990.

HUBER, J.T. et al. Heat stress interactions with protein, supplemental fat, and fungal cultures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n. 7, p. 2080–2090, 1994.

JIANG, Y. et al. Effects of the dose and viability of *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Diversity of ruminal microbes as analyzed by Illumina MiSeq sequencing and quantitative PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 325-342, 2017.

JOUANY, J.P. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 250-264, 2006.

KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, p. 59-91, 2002.

KAPLAN, M. H. et al. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. **Immunity**, v. 4, p. 313-319, 1996.

KIM S. Y. et al. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. **Journal of Korean Medical Science**, v. 21, p. 781-789, 2006.

KISELEVA, E. P.; NOVIK, G. I. Probiotics as immunomodulators: substances, mechanisms and therapeutic benefits. **In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. p.1864-1876, 2013.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161-165, 2007.

KREGIEL, D.; BERLOWSKA, J. Evaluation of yeast cell vitality using different fluorescent dyes. **Food Chemistry and Biotechnology**, v. 73, p. 5-14, 2009.

KUCSERA, J.; YARITA, K.; TAKEO, K. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p. 19-21, 2000.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 1068-1079, 2014.

LACETERA, N. et al. Lymphocyte functions in dairy cows in hot environment. **International Journal of Biometeorology**, v. 50, p. 105-110, 2005.

LACY, P.; STOW, J. L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**, v. 118, p. 9-18, 2011.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid Determination of Yeast viability. **In: Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

MACIEJEWSKI-LENOIR, D. et al. Langerhans cells release prostaglandin D₂ in response to nicotinic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2637-2646, 2006.

MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Symposium: direct-fed microbials and rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

MAYES, P.A. Structure and function of the water-soluble vitamins. **In: Harper's Biochemistry**, 23rd Edition, p. 573, 1993.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298-300, 2002.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **Advances in Immunology**, v. 343, p. 338-344, 2000.

MILLER, B. L.; MEISKE, J. C.; GOODRICH, R. D. Effects of grain and concentrate level on B vitamin production and absorption in steers. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 473-483, Feb. 1986.

MORAN, C. A. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. **In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM**, 2004, Nicholasville. Proceedings... Nicholasville: Alltech Publications, p. 283-296, 2004.

MORELLI, S. S. et al. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. **Research and Reports in Biology**, v. 6, p. 171-189, 2015.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**. v. 28S, p. C2-C13, 2010.

NESARGIKAR, P. N.; SPILLER, B.; CHAVEZ, R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 103-111, 2012.

NEWBOLD, C. J. et al. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1811-1818, 1995.

NEWBOLD, C. J.; McINTOSH, F.M.; WALLACE, R.J.; Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. **Canadian Journal of Animal Science**. v.78, p. 241-244, 1998.

NISBET, D. J.; MARTIN, S. A. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 11, p. 4628-4633, Nov. 1991.

Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Ed. 7^a, Washington, D.C., National Academic Press, 381 p., 2001.

OLIVEIRA, B. M. L. et al. Suplementação de vacas leiteiras com *Sacharomyces cerevisiae* cepa KA500, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1174-1182, 2010.

PADGETT, D. A.; GLASER, R. How stress influences the immune response. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 444-448, 2003.

POPPY, G. D. et al. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6027-6041, 2012.

POSADAS, G. A et al. Yeast pro- and paraprobiotics have the capability to bind pathogenic bacteria associated with animal disease. **Translational Animal Science**, v. 1, p. 60-68, 2017.

- RAUTRAY, A. K. et al. Potential of probiotics in livestock production. **EAMR**, v. 1, p. 20-28, 2011.
- RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature Immunology**, v. 2, p. 361-367, 2001.
- RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986-1997, 2009.
- RHOADS, R. P. et al. Nutritional interventions to alleviate the negative consequences of heat stress, **Advances in Nutrition**, v.4, p.267-276, 2013.
- ROSSI, F. et al. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. **Animal Research**, v.53, p. 177-186, 2004.
- RUNGRUANG, S. et al. A dose-response evaluation of rumen-protected niacin in thermoneutral or heat stress lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1-12, 2014.
- SALVATI, G.G.S. et al. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **Journal of Dairy Science**. v. 98, p. 4062-4073, 2015.
- SCHAEFER, L. Complexity of Danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 35237-35245, 2014.
- SHEN, L.; TURNER, J. R. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, p. G577-G582, 2006.
- SHI, Y.; EVANS, J. E.; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature**, v. 425, p. 516-521, 2003.
- SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland**, v. 7, p. 135-146, 2002.
- SULLIVAN, M. L.; BRADFORD, B. J. Viable cell yield from active dry yeast products and effects of storage temperature and diluent on yeast cell viability. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 526-531, 2011.
- SWARTZ, D. L. et al. Effect of yeast cultures on performance of lactating dairy cows: a field study. **Journal of Dairy Science**, v. 10, p. 3073-3080, 1994.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 827 p., 2000.

TRISTAN, D; MORAN, C. A. The efficacy of feeding a live probiotic yeast, Yea-Sacc[®], on the performance of lactating dairy cows. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, p. 1-6, 2015.

TURNER J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Immunology**, v. 9, p. 799-809, 2009.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S24-S32, 2010.

UEHARA, A. et al. Various human epithelial cells functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 3100-3111, 2007.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, p. 353-356, 1993.

WHEELOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 644-655, 2010.

WILLIAMS, P. E.; NEWBOLD, C. J. Rumen probiosis: the effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: HARESIGN, W.; COLE, D. J. A. (Ed.). **Recent Advances in Animal Nutrition**. Butterworths, London, England, p. 211, 1990.

WRINKLE, S. R.; ROBINSON, P. H.; GARRETT, J. E. Niacin delivery to intestinal absorptive site impacts heat stress and productivity responses of high producing dairy cows during hot conditions. **Animal Feed Science and Technology**, Shannom, v.175, n.1- 2, p. 33-47, 2012.

YUAN, K. et al. Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3236-3246, 2015.

ZAWORSKI, E.M. et al. Effects of feeding various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 3081-3098, 2014.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZIMBELMAN, R. B. et al. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. In: **Proc 24 th Annual Southwest Nutrition and Management Conference**, p. 158-168, 2009.

ZIMBELMAN, R. B.; BAUMGARD, L. H.; COLLIER, R. J. Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2387-2394, 2010.

4 ARTIGO

Interpretative Summary: Effect of viable yeast products on performance, digestion, thermoregulation, and immunity of lactating cows during summer. Silva et al. The supplementation of dairy cows with two yeast products differing in the strain of viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* reduced milk somatic cell count and had no effect on lactation performance, intake, and digestibility. The reduction in milk somatic cells was associated to a trend for reduced concentration of monocytes in blood. Yeast supplementation also increased interleukin 4 in blood after rabies vaccination. The type of yeast product affect cell-mediated immunity and thermoregulation.

Running Head: *Viable Yeast for Dairy Cows*

Effect of viable yeast products on performance, digestion, thermoregulation, and immunity of lactating cows during summer

Karina T. Silva,*‡ Marcos N. Pereira,*†¹ Fabiana F. Cardoso,* Eugenio F.

Barbosa,* Tatiane Fernandes,* Ana Paula Peconick, Renata A. N. Pereira, ‡†

Marcos Aronovich§, Karin C. Scheffer[#]

*University of Lavras, Lavras 37200-000, Brazil

‡Minas Gerais Agricultural Research Enterprise (Epamig), Lavras 37200-000, Brazil

†Better Nature Research Center, Ijaci 37205-000, Brazil

§Rio de Janeiro State Agricultural Research Enterprise (Pesagro), Niterói 24120-191, Brazil

[#]Pasteur Institute, São Paulo, 01311-000, Brazil

¹ Corresponding author: +55 35 3829 1689. Marcos Neves Pereira, email – mpereira@dzo.ufla.br

ABSTRACT

This experiment evaluated if the supplementation of lactating dairy cows with products containing different strains of live *Saccharomyces cerevisiae* would induce differential response in lactation performance, digestibility, plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and immunity during Brazilian summer (THI > 68 for 86.4% of time). Thirty Holsteins (169 ± 87 DIM) were individually fed on TMR for a 2-week covariate period and then paired blocked before assignment to a treatment for 56 d. Treatments were products containing strains SC 47 or NCYC 996 (Phileo Lesaffre) or Control (CTL). Pre-planned contrasts were: C1) CTL vs. SC 47 + NCYC 996 and C2) SC 47 vs. NCYC 996. Yeast products (10 g/cow/d) were mixed to a cup of ground corn and top dressed to the TMR in the morning. Viable and non-viable cells/g were: 1.00 x 10¹⁰ and 1.03 x 10¹⁰ for SC 47 and 1.76 x 10¹⁰ and 0.93 x 10¹⁰ for NCYC 996, respectively. Yeast products did not affect the yields of milk (35.8 kg/d) and solids (1.048 kg/d protein, 0.953 kg/d fat and 1.572 lactose) and DMI (19.4 kg/d). Plasma niacin concentration did not differ. The rectal temperature at 1900 h tended to be lower (39.1 vs. 39.4°C) on NCYC 996 relative to SC 47 and the frequency of rectal temperature ≥ 39.2°C was reduced at 1300 h (37.5 vs. 48.1%) and 1900 h (41.8 vs. 58.1%) on NCYC 996 relative to CTL. The respiratory frequency and sweating rate did not change. The Linear SCC scores were 4.94 for CTL (384,000 cells/mL), 4.17 for SC 47 (225,000 cells/mL), and 4.37 for NCYC 996 (258,000 cells/mL) ($P < 0.01$ for C1). The cell-mediated immune response was evaluated on days - 1, 7, and 15 and the humoral response on days - 1, 7, and 23 relative to vaccination with an inactivated rabies vaccine on d 35. The titer of rabies antibodies in serum and Interleukin-4 (IL-4) were increased and Interferon Gamma (IFN γ) was reduced in response to vaccination.

Monocytes in blood were reduced by NCYC 996 relative to SC 47 on d - 1 and were increased on d 15. Compared to SC 47, NCYC 996 also tended to increase IL-4 on d - 1 and reduced IL-4 on d 15. The titer of rabies antibodies and IFN γ were not affected by treatment. The total tract apparent digestibility of nutrients and the daily urinary allantoin excretion did not differ. Yeast products increased ingestion time per day and per unit of DMI and meal duration relative to CTL, at similar DMI. Cows on NCYC 996 showed selective sorting behavior in favor of feed particles > 19 mm at night and SC 47 induced rejection of long feed particles. Glucose and urea-N concentrations in plasma did not differ. Yeast supplementation had no impact on animal performance and diet digestibility, but reduced milk SCC. The effect on cell-mediated immune response and thermoregulation differed between the yeast products evaluated. Yeast supplementation tended to increase IL-4 after vaccination, tended to reduce blood monocytes before vaccination, and reduced milk SCC.

Key words: heat stress, mastitis, milk somatic cell count, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCTION

Saccharomyces cerevisiae derived feed additives have been adopted for decades by the dairy industry mainly as natural modulators of ruminal fermentation (Pinloche et al., 2013; Jiang et al., 2017), capable of inducing improvement in nutrient digestibility and assisting in the control of ruminal acidosis (AlZahal et al., 2014; Li et al., 2015). A proposed mode of action of viable yeast, in addition to providing growth factors for ruminal microorganisms, is the utilization of oxygen and the effect on the redox potential of ruminal contents (Marden et al., 2008).

Although the effect of yeast supplementation on lactation performance seems to be variable across experiments, thoroughly meta-analysis suggest that the average effect

is positive (Desnoyers et al., 2009; De Ondarza et al., 2010; Poppy et al., 2012). The variation across experiments in animal response to *S. cerevisiae* supplementation may be the result of differences in products (strain, viable/non-viable cells), dosage, diet composition, feeding management, environment, stage of lactation, duration of supplementation, among others. A potential factor in the animal response to live *S. cerevisiae* supplements is the type of strain. Newbold et al. (1995) have shown differences in the capacity of *S. cerevisiae* strains to modulate ruminal microbial yield in vitro and it has been suggested that the structural complexity of the glucans in yeast cell walls may determine their immunomodulatory effects (Batbayar et al., 2012).

Heat stress causes major financial loss to the global dairy industry by reducing milk yield, reproductive efficiency, and longevity of dairy cows. It has been shown that the supplementation of dairy cows with a product containing viable cells of *S. cerevisiae* increased the concentration of niacin in plasma (Salvati et al., 2015), related to the beneficial effect of yeast on body temperature and respiration rate. The positive effect of yeast supplementation on plasma niacin concentration, thermoregulation, and feed efficiency of dairy cows was also observed in response to the supplementation of non-viable yeast cells (Dias et al., 2018), suggesting that this mode of action is not dependent on the presence of viable cells. Reports in the literature have shown that yeast products based on viable (Schwartz et al., 2009; Salvati et al., 2015) and non-viable (Huber et al., 1994; Bruno et al., 2009; Liu et al., 2014; Dias et al., 2018) cells can reduce the rectal temperature of dairy cows subjected to heat stress.

Yeast cell wall polysaccharides have immunomodulatory action modulated by the mucosal associated lymphoid tissue in the digestive tract (Izcue et al., 2006) and the humoral and cell-mediated adaptive immune system (Broadway et al., 2015). Li et al.

(2015) observed that the supplementation of dairy cows with non-viable yeast increased the pro-inflammatory cytokine TNF α in blood before a ruminal acidosis induction protocol and reduced TNF α during acidosis. Bach et al. (2018) observed that the ruminal epithelium of dairy cows supplemented with viable yeast changed the expression of genes involved in the immune response after 7 d of exposure to the product and increased genes regulating inflammation and epithelial barrier in the rumen and genes coding for antimicrobial peptide in the colon. Yuan et al. (2015) observed that yeast culture supplementation around calving increased platelet count and reduced neutrophils, increased humoral immunity evaluated by the concentration of anti-ovalbumin IgG in plasma following an ovalbumin challenge, increased fecal IgA concentration, and modulated inflammation in the uterine tissue.

The objective of the present study was to evaluate the effect of two commercial products of viable cells of *S. cerevisiae* containing strains SC 47 or NCYC 996 on lactation performance, ruminal function, total tract digestibility, thermoregulation, milk SCC, and immunity of dairy cows during the warm summer months of Southeast Brazil. We hypothesized that live yeast supplementation would improve lactation performance by increasing diet digestibility and heat dissipation and type of strain would determine the magnitude of the response. It was our interest to evaluate how humoral and cell-mediated immunity would be affected by the type of strain.

MATERIALS AND METHODS

The protocol was approved by the University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals.

Location, Cows, Treatments, and Experimental Design

The experiment was conducted from December 15th 2014 to February 23th 2015, in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center, located at Ijaci, Minas Gerais, Brazil (<http://www.holandesflamma.com.br/>). The research center is located at 846 m above sea level, 21° 09' 52.41" latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west. Environmental temperature and humidity at the center of the barn were measured at 30-min intervals with a digital thermometer (EasyLog-USB-2-LCD, Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) at 2.5 m from the floor. The Temperature-Humidity Index (THI) (Table 1 and Figure 1) was calculated according to Yousef (1985): $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$; where T = temperature (°C) and DP = dew point (°C).

Thirty Holstein cows (9 primiparous) were individually fed the same diet for a 2-week covariate period. At the end of the covariate period, cows were paired blocked primarily by parity and secondarily by milk yield. Within a block, each cow received one of 3 treatments for 56 d, in a covariate adjusted randomized block design with repeated measures over time. Treatments were: *Saccharomyces cerevisiae* strain NCYC 996 (Procreatin7, Lesaffre Feed Additives, Toluca, Mexico), *S. cerevisiae* strain SC 47 (Biosaf, Lesaffre Feed Additives, Marquette-Lez-Lille, France) or Control (CTL). Mean milk yield, BW, DIM, and SCC at blocking were, respectively: 37.3 kg/d, 609 kg, 165 d, and 403,000 cells/mL for NCYC 996; 37.6 kg/d, 621 kg, 174 d, and 563,000 cells/mL for SC 47; and 37.3 kg/d, 613 kg, 178 d, and 493,000 cells/mL for CTL.

Ten grams of the yeast products were mixed to a cup of ground corn and top dressed to the diet offered in the morning and cows on CTL received the same amount of corn. The concentrations of viable and non-viable cells per gram of product were enumerated on days 21 and 56 of the comparison period (Table 2). The yeast product

was rehydrated in peptone water (0.1%) warmed to 30°C and allowed to stand for 10 min before the addition of the same volume of a methylene blue solution (0.01%). Cell count was performed in a Neubauer chamber with a bright field optical microscope (400x magnification), according to the recommendations of Lee et al. (1981). Non-viable cells stain dark blue, while viable cells stain light blue due to the difference in cell permeability to the die.

Feed management and sampling

The TMR was mixed 2 x/d in a 1.2 m³ vertical stationary mixer (Unimix 1200, Casale, São Carlos, Brazil) after weighting feed ingredients in precision scales. Cows had access to new feed at approximately 0700 h and 1300 h. Feed was offered in sufficient quantity to obtain 7 to 10% of the offered as daily refusals and was pushed at least 10 x/d. Individual cow intake was assessed throughout the experiment, by recording the amount of feed offered and orts daily (as fed basis). Samples of ingredients were collected daily, frozen, and composite samples made per week. Likewise, ort samples were collected daily and composited per cow per week. Composite samples were dried in forced-air oven at 55°C for 72 h and ground through a 1-mm diameter mesh screen in a Willey mill (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA). The DM concentration was determined by drying at 100°C for 24 h. The CP concentration was determined by micro Kjeldahl analysis and ether extract (**EE**) according to AOAC International (2012). Ash was analyzed by incineration at 550°C for 8 h. The ash-free NDF was determined by filtration in porous crucibles with heat stable amylase and sodium sulfide (Van Soest et al., 1991). Starch was analyzed enzymatically according to Hall (2009). The NFC fraction was calculated as 100 - (CP

+ EE + ash + NDF). The composition of the offered TMR in ingredients and of the consumed TMR in nutrients are reported in Table 3.

Measurements and Analytical Procedures

Cows were milked 3 x/d in an adjacent herringbone parlor starting at 0500, 1300, and 2000 h and milk yield was recorded daily. Proportional milk samples from each milking were obtained on d 11 to 14 of the covariate period and d 6 and 7 of each week during the comparison period. Milk solids, SCC, and MUN concentrations were measured by mid-infrared analysis (Delta FTIR, Delta Instruments Inc., Drachten, The Netherlands) at the Federal University of Minas Gerais milk quality laboratory (LabUFMG, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil). Milk energy secretion (**Milk E**; Mcal/d) was calculated as (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM (kg/d) was calculated as: $\text{Milk E}/0.70$ (assumes a concentration of energy of 0.70 Mcal/kg for milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose according to the NRC 2001 equation). The 4% FCM (kg/d) was calculated with the Gaines equation (NRC, 2001): $0.4 \times \text{kg of milk} + 15 \times \text{kg of fat}$. The SCC was transformed to a linear scale from 0 to 9 (**Linear SCC**) in which scores represented the following values of SCC ($\times 1,000$ cells/mL): 12.5 for SCC score 0; 25 for SCC score 1; 50 for SCC score 2; 100 for SCC score 3; 200 for SCC score 4; 400 for SCC score 5; 800 for SCC score 6; 1,600 for SCC score 7; 3,200 for SCC score 8; and 6,400 for SCC score 9. The SCC score was calculated from the natural logarithm of the measured SCC (1,000 cells/mL) and the above mentioned SCC value of each score: $\text{SCC score} = -3.6438 + 1.4427 \times \text{Ln}(\text{SCC})$. Negative values were rounded to zero. The BCS (1 to 5 scale, thin to fat) was measured by three independent evaluators at the end of the covariate period and on d 14, 28, and 56 of the comparison period. The

mean value was used to describe the experimental units. After the morning milking, BW (kg) was measured on the same days as BCS. The daily BW gain (kg/d) was calculated as the slope of the linear regression of BW over time.

The total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and non-NDF OM (% of intake) were determined on d 42 to 44 by total collection of feces in buckets. Feces were collected concurrent to defecation during three 8-hour sampling periods and weighed. The second and third sampling periods began 8 h later than the previous sampling, to represent a 24-h collection period. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen during the collection period and a composite sample was formed. Composite fecal samples were dried for 72 h at 55°C in a forced air oven and ground through a 1-mm mesh screen (Wiley mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100°C for 24 h. Concentrations of NDF and ash were determined as described previously. The digestible OM intake (**DOMI**, kg/d) was calculated.

Total urinary output was collected in buckets, simultaneously to fecal sampling, to estimate the relative ruminal microbial synthesis based on purine derivate excretion (mmol/d). A 20% sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L buckets and urine was added to it during the collection period. At the end of the 3-day collection period, composite urine samples were diluted 1:5 with a 4% sulfuric acid solution and frozen at -20°C. Allantoin was analyzed as described by Chen and Gomes (1992).

Chewing activity and ingestion behavior were measured on d 42. Chewing was evaluated by continuous observation of the buccal activity of each cow at 5-min intervals for 24 h. Buccal activities were: water ingestion, feed ingestion, rumination, and idleness. Chewing time (min/d) was the sum of ingestion and rumination times.

Chewing, ingestion, and rumination per unit of DMI were calculated with the DMI of the day of chewing evaluation. A meal was defined by at least two consecutive 5-min ingestion events following at least 10 min of idleness or rumination. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer. Five evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

Feed sorting behavior was evaluated on d 45. The proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen and above and below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator was evaluated at 0600 and 1300 h for the offered TMR and at 1200, 1900, and 0600 h for refusals. Feed refusals at 1200 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen \times kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen \times kg of TMR offered - % orts retained on screen \times kg of orts. For the calculation of starch and NDF sorting behaviors the predicted intake of a nutrient was: % of nutrient in offered TMR DM \times kg of DMI. The observed intake was: % of nutrient in offered TMR DM \times kg of offered TMR DM - % of nutrient in orts DM \times kg of orts DM. The selection index was: $100 \times (\text{observed intake}/\text{predicted intake})$. Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent preferential intake, and equal to 100% represent no selection. The proportions of daily TMR intake between 0700 and 1300 h, 1300 and 1900 h, and 1900 and 0700 h were measured

Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on days 25 and 53 to determine plasma urea-N (**PUN**). Samples for PUN were obtained immediately before the first daily feeding and at 2 and 4 h after feeding. The blood, collected in vacutainer

tubes containing EDTA, was centrifuged at 1,800 x g for 10 min and the plasma was frozen at -20°C. The PUN content was analyzed with a laboratory kit (Urea 500, Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil). Plasma glucose concentration was measured on days 11, 25, 39, and 53 of the comparison period, on blood samples obtained at 0, 2, 4, and 12 h post-feeding with vacutainer tubes containing EDTA and potassium fluoride and analyzed with a laboratory kit (Glicose Enzimática Líquida, Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil).

The respiratory frequency and rectal temperature were measured on d 4 and 7 of each week of the comparison period starting at 0700, 1300, and 1900 h. Measurements were made randomly within block. Rectal temperature was measured with digital thermometers (G-Tech TH186 Onbo Eletronics, Shenzhen, China. Accuracy of 0.1 °C). The respiration rate (breaths/min) was the mean of 3 consecutive 30 s flank movement countings.

The sweating rate was evaluated once per week (d 7) at 1500 h, randomly within block. The colorimetric technique used paper discs impregnated with cobalt chloride (Schleger and Turner, 1965). Filter paper (Whatman n° 1, 11 µm porosity) was immersed in a 10% cobalt chloride solution and then oven dried at 105°C for 12 h. Paper discs (0.5 cm diameter) were cut and dried for 2 min. Three discs were placed on histological slides and fixed with transparent adhesive tape. The slides with disks were immediately placed in a sealed glass containing silica. A 3 × 10 cm rectangular area was shaved on the left flank of each cow, 10 cm below the lumbosacral vertebrae, 1 d before the measurement. The tape with discs was fixed over the shaved area. The time for each disc to change color from blue violet to light pink was recorded and the mean

value was used to calculate the sweating rate ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$) as: $38,446.6/T$, where T is time in seconds (Schleger and Turner, 1965).

On days 14 and 56, blood samples from the coccygeal vessels were obtained at 1300 h to determine plasma niacin concentration. Blood was collected in vacuum tubes containing EDTA and centrifuged at $2,118 \times g$ for 10 min to obtain plasma, which was kept at -20°C until analysis. Plasma niacin concentration was analyzed with a VitaFast niacin microbiological assay (R-Biopharm, Dharmstadt, Germany).

Bovine immune response was evaluated after an immune challenge with an inactivated Rabies vaccine (Raivacel Multi, Vallée, Montes Claros, Brazil) on d 36. The herd was routinely vaccinated with the same vaccine at 10-month intervals. Serum samples from the coccygeal blood was obtained on days -1 (d 35 of experiment), 7, and 15 relative to vaccination. Immune response was evaluated by measurement of cytokines interleukin-4 (**IL-4**) and interferon gamma (**IFN γ**) with Bovine IL-4 and Bovine IFN- γ ELISA competitive tests (NeoBiolab, Cambridge, MA). The cellular immune response was evaluated by complete hemogram within 1 hour of blood sampling in a commercial laboratory (Laboratório Santa Cecília, Lavras, Brazil). The neutralization of anti-rabies antibodies in serum was evaluated with the Simplified Fluorescence Inhibition Microtest (SFIMT) according to Favoretto et al. (1993).

Statistical Analysis

Data obtained at the end of the standardization period and over time during the comparison period was analyzed as repeated measures with the Mixed procedure of SAS statistical software (Littell et al., 1998). The statistical model for variables obtained over time contained the continuous covariate effect (measurement of the same variable at the end of the covariate period), the random effect of block (1 to 10), and the fixed

effect of yeast (CTL, NCYC 996, SC 47), time (Days or weeks), and the interaction of yeast and time. The mean square for the effect of cow nested within yeast was the whole plot error. The best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order autoregressive, compound symmetry, and non-structured. Degrees of freedom were estimated by using the Kenward-Roger option in the model statement. For variables measures once during the experiment, a similar model was used, but without the covariate, the time effect, and the interaction between yeast and time. Pre-planned contrasts were: C1) CTL vs. (SC 47 + NCYC 996) and C2) SC 47 vs. NCYC 996. The proportion of cows with rectal temperature $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ was analyzed with PROC GENMOD using logistic regression for binomial data and contrasts were CTL vs. SC 47 and CTL vs. NCYC 996. Statistical significance and trends were considered at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.10$, respectively.

RESULTS

The temperature, humidity, and THI inside the barn are in Table 1. The mean THI during the experiment was 72.9, ranging from 63.8 to 86.3. The proportion of THI values ≥ 68 was 86.4% of time and THI ≥ 72 occurred for 45.6% of time. Humidity got up to 99% at night, and had a minimum of 36.5%. The 30-min interval THI measurements peaked between 1300 h and 1400 h (Figure 1). During the experiment, more than 9 hours of THI greater than 68 occurred every day. The natural environment was inductive of heat stress in lactating Holsteins.

The concentration of viable and non-viable yeast cells in the products is in Table 2. The proportion of viable cells in total cells was reduced during storage at room temperature from day 21 to 56 of the experiment, mainly for the SC 47 product. The product with strain NCYC 996 had more total cells/g and greater cell viability than SC

47. The consumed dosage of viable yeast cells based on the mean of the two counting of each product was 18×10^{10} cells/d for NCYC 996 and 10×10^{10} cells/d for SC 47 and the dosage of non-viable cells was 9×10^{10} cells/d for NCYC 996 and 10×10^{10} cells/d for SC 47.

Yeast supplementation did not affect ($P \geq 0.15$ for C1) DMI, the secretions of milk and solids, body tissue deposition, and feed efficiency (Table 4). Strain NCYC 996 tended ($P = 0.09$ for C2) to reduce the daily lactose secretion relative to SC 47, but no other difference between strains was observed for the above mentioned variables ($P \geq 0.15$ for C2). Both yeast products reduced the Linear SCC relative to CTL ($P < 0.01$ for C1), regardless of type ($P = 0.40$ for C2). The absolute reduction in SCC relative to CTL (384,000 cells/mL) was - 159,000 cells/mL for SC 47 and - 126,000 cells/mL for NCYC 996.

The rectal temperature and respiration rate during the day and the sweating rate in the afternoon are in Table 5. There was no detectable treatment effect ($P \geq 0.32$ for C1 and C2) on the respiration and sweating rates, although there was a trend ($P = 0.06$ for C2) for strain NCYC 996 to reduce the mean rectal temperature at 1900 h (39.1°C) relative to SC 47 (39.4°C). Strain NCYC 996 also reduced the proportion of cow/observations of rectal temperature $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ at 1300 h ($P = 0.05$) and 1900 h ($P < 0.01$) relative to CTL (Table 6). Strain SC 47 did not affect ($P \geq 0.72$) the frequency of rectal temperatures $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ relative to CTL. Plasma niacin concentration (Table 5) evaluated in days 14 and 56 of the experiment was not affected ($P \geq 0.62$ for C1 and C2) by yeast supplementation.

Table 7 reports ruminal microbial yield and the total tract apparent digestibility of nutrients. There was no evidence for an improvement in microbial yield and growth

efficiency ($P \geq 0.28$ for C1 and C2) neither for gain in total tract diet digestibility ($P \geq 0.20$ for C1 and C2) in response to yeast supplementation. The DOMI during the days of digestibility measurement did not differ ($P \geq 0.24$ for C1 and C2). Plasma glucose and PUN concentrations were not responsive ($P \geq 0.12$ for C1 and C2) to the treatments (Table 8), except for a weak trend ($P = 0.12$ for C1) for yeast products to increase PUN 4 h post-feeding.

Yeast supplementation affected chewing and ingestion behavior (Table 9). Cows supplemented with yeast had longer duration of ingestion behavior (min/d) than CTL ($P = 0.02$ for C1), at similar DMI ($P = 0.62$ for C1). The duration of ingestion behavior per unit of DMI was increased ($P < 0.01$ for C1) by the yeast supplements. Meal duration was increased by yeast ($P = 0.01$ for C1), at a similar number of meals per day ($P = 0.23$ for C1). The duration of the first daily meal was numerically increased by yeast relative to CTL (+ 5.1 min), but the difference did not approach statistical significance ($P = 0.23$ for C1). There was no difference ($P \geq 0.30$ for C2) between yeast products on chewing and ingestion behavior. Treatments had no impact ($P \geq 0.29$ for C1 and C2) on the proportion of the daily intake in the morning, afternoon, and night (Table 10). Particle size sorting behavior (Table 10) in the morning and afternoon also did not vary ($P \geq 0.16$ for C1 and C2). However, strain NCYC 996 induced ($P = 0.01$) selective sorting in favor of feed particles longer than 19 mm at night (118%) at SC 47 induced refusal of long feed particles (90%).

The majority of the hemogram parameters were not affected ($P \geq 0.11$ for C1 and C2) by yeast supplementation (Table 11), except for the trend for less monocytes ($P = 0.08$ for C1) immediately before rabies vaccination (Day - 1) on yeast supplemented cows than on CTL. Strain NCYC 996 reduced monocytes on Day - 1 ($P = 0.04$ for C2)

and increased monocytes on Day 15 after vaccination ($P = 0.03$ for C2) relative to SC 47.

The titer of rabies antibodies and serum cytokines are in Table 12. In response to vaccination, rabies antibodies and interleukin-4 concentrations in serum were increased and IFN γ was reduced in all treatments, indicative of a polarization for the T Helper cell type 2 (Th2) immune response profile (Brown et al., 1998). A significant ($P = 0.05$) interaction between treatment and day was detected for IL-4. There was a weak trend ($P = 0.12$ for C2) for strain NCYC 996 to increase IL-4 on Day - 1 and to reduce ($P = 0.03$ for C2) it on Day 15 relative to SC 47. The mean response in IL-4 to yeast supplementation tended to be positive ($P = 0.06$ for C1). Yeast supplementation and type of product had no effect ($P \geq 0.19$ for C1 and C2) on the titer of rabies antibodies and IFN γ concentration in response to rabies vaccination.

DISCUSSION

Our goal of evaluating the effect of type of yeast strain on dairy cow performance, digestion, thermoregulation, and immunity was to some extent compromised by the fact that the concentration of viable and non-viable cells per gram differed between yeast products. The product containing strain NCYC 996 had higher concentration of viable cells and similar concentration of non-viable cells than the product containing strain SC 47 (Table 2). The interpretation of the data must consider that strain and dosage are intrinsically confounded.

Yeast products had no effect on diet digestibility, lactation performance, and plasma niacin concentration. Although there was some evidence for a reduction in rectal temperature with NCYS 996 relative to SC 47, the effect of yeast supplementation on body temperature was minor and no effect was detected on respiration and sweating

rates. Salvati et al. (2015) observed that the same NCYC 996 product induced a positive response in milk yield and plasma niacin concentration, and reduced the respiration rate and rectal temperature of cows fed on similar experimental condition to this experiment. In the experiment of Salvati et al. (2015) the dosage of yeast cells was higher (25×10^{10} viable cells/d and 5×10^{10} non-viable cells/d), milk yield (26.0 kg/d) was lower, at similar DMI (19.3 kg/d), the diet did not have sodium bicarbonate, and the environment was not as warm as in this experiment. Yeast dosage, milk yield per cow, diet composition, and environment, as well as other uncontrolled experimental factors, may have contributed to the lack of cow response to yeast supplementation in this experiment. Surveys of the literature (Desnoyers et al., 2009; De Ondarza et al., 2010) have reported the inconsistency in lactation response of dairy cows to the supplementation of yeast, although the average cow response is apparently positive.

Although there was no evidence for an effect of yeast products on cow performance and digestion, both products were effective in reducing milk SCC. Reductions in milk SCC of dairy cows in response to yeast supplementation have been observed by others (Oliveira et al., 2010; Nocek et al., 2011; Zaworski et al., 2014; and Yuan et al., 2015), demonstrating the immunomodulatory capability of yeast based feed additives. Viable yeast has been shown to bypass the digestive tract of sheep (Durand-Chaucheyras et al., 1998) and affected gene expression in the colon of cows (Bach et al., 2018). This suggests the possibility of post-ruminal action on the mucosal associated lymphoid tissue of the digestive tract (Izcue et al., 2006), as in monogastric animals (Trckova et al., 2014; Jacob and Pescatore, 2017).

In this experiment, yeast products were mixed to corn and individually fed on the top of the TMR offered in the morning to guarantee the consumption of the desired

dosage. This practice may have increased the proportion of yeast cells bypassing the ruminal fermentation. Toledo et al. (2017) observed that top-dressing rumen-protected methionine to dairy cows once per day induced an abrupt increase in plasma methionine concentration and a return to the basal concentrations by 24 hours. Dias et al. (2018) detected positive effects of a non-viable yeast product on feed efficiency, plasma niacin concentration, and evaporative heat loss of dairy cows by pulse dosing yeast at 8-hour intervals, as a way of promoting a steady supply of the additive to the ruminal fermentation. In this experiment, top-dressing yeast 1 x/d may have reduced the ruminal availability of yeast cells and may have increased the passage of cells to the lower digestive tract, explaining the reduction in milk SCC without affecting digestion, plasma niacin concentration, thermoregulation, lactation performance, and intake. When yeast supplementation was capable of increasing plasma niacin concentration and affected thermoregulation (Salvati et al., 2015; Dias et al., 2018), no effect was detected on milk SCC, suggesting that the mode of action on thermoregulation is distinct from the immunomodulatory effect of yeast cells.

The reduction in milk SCC in response to yeast supplementation was associated to a trend ($P = 0.08$ for C1) for reduced monocytes on day 35, immediately before rabies vaccination (Day -1). No other marker of cell-mediated immunity was affected by treatment. Mononuclear phagocytes are important cells on innate and adaptive immune response of the mammary gland (Rainard and Riollet, 2006). The type of yeast product differed on the effect upon blood monocytes concentration. The product with strain NCYC 996 reduced monocytes relative to SC 47 on Day -1, but increased it on Day 15 post-vaccination. Low monocytes in blood were related to low SCC in milk and type of product affected cell-mediated immunity.

The increase in antibody titers in response to rabies vaccination shows that the vaccination protocol was effective in inducing an immune challenge. The anti-rabies antibodies peaked 7 days after vaccination and high up to Day 23. Yeast supplementation had no effect on the titer of anti-rabies antibodies, suggesting that the additive had no effect on the level of antibody-mediated immunity. Interleukin 4, a cytokine associated to Th2 helper cells, increased and IFN γ , associated to Th1 cells, was reduced after vaccination, a described feature of the Th2 immune response profile and of the antagonism between Th1 and Th2 response functions (Brown et al., 1998). Yeast supplementation tended ($P = 0.06$ for C1) to increase IL-4, suggesting that the concentration of this cytokine may be related to the low SCC in milk. The Th2 immune response is predominantly humoral, the increase in IL-4 may have induced lower recruiting of leukocytes to the mammary gland (Rainard and Riollot, 2006). The type of product determined the pattern of variation on blood IL-4 concentration. Product NCYC 996 reduced IL-4 15 days post-vaccination compared to SC 47, suggesting a faster return to homeostasis after vaccination.

Top-dressing yeast with ground corn 1 x/d increased the duration of the ingestion behavior at similar DMI, increased ingestion time per DMI and meal duration, but did not affect the number of meals per day and the proportion of daily intake in the morning, afternoon, and night. Bach et al. (2007), Allen and Ying (2012), and Salvati et al. (2015) top-dressed yeast 1 x/d to the diet and Dias et al. (2018) gave oral bolus of yeast 3 x/d and did not observe effects of yeast products on the ingestion behavior of dairy cows. DeVries and Chevaux (2014) observed a trend for increased number of meals per day at similar meal duration when dairy cows were top-dressed 1 x/d with a viable yeast product. The effect of yeast supplementation on ingestion behavior is

controversial and needs better evaluation; no experiment evaluated the effect of yeast products added as an ingredient to the offered TMR.

CONCLUSIONS

The supplementation of dairy cows with viable yeast products had no impact on lactation performance, intake, and diet digestibility, but reduced milk SCC. The reduction in milk SCC was related to trends of lower monocytes and higher IL-4 in blood relative to CTL. The type of yeast product affected blood monocytes and IL-4 concentrations, but we could not determine if the number of supplemented cells or the type of strain mediated the effect.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fapemig (Minas Gerais Foundation for Research Support, Belo Horizonte, Brazil) and CNPq (National Research Council, Brasilia, Brazil) for the grants to the authors, to Phileo Lesaffre Animal Care (Campinas, Brazil) for partially funding the project, to the members of Grupo do Leite of the University of Lavras for the assistance during data collection and animal care, and to Lucas J. Lara (University of Lavras, Brazil) for the assistance during immunoassays.

REFERENCES

- Allen, M. S., and Y. Ying. 2012. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal starch digestion are dependent upon dry matter intake for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 95:6591–6605.
- AlZahal, O., L. Dionissopoulos, A. H. Laarman, N. Walker, and B. McBride. 2014. Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:7751–7763.

- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Bach, A., C. Iglesias, and M. Devant. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:146–153.
- Bach, A., I. Guasch, G. Elcoso, F. Chaucheyras-Durand, M. Castex, F. Fàbregas, E. Garcia-Fruitos, and A. Aris. 2018. Changes in gene expression in the rumen and colon epithelia during the dry period through lactation of dairy cows and effects of live yeast supplementation. *J. Dairy Sci.* 101:2631–2640.
- Batbayar, S., D. H. Lee, and H. W. Kim. Immunomodulation of fungal β -glucan in host defense signaling by Dectin-1. 2012. *Biomol. Therap.* 20:433–445.
- Broadway, P. R., J. A. Carroll, and N. C. B. Sanchez. 2015. Live yeast and yeast cell wall supplements enhance immune function and performance in food-producing livestock: A review. *Microorganisms.* 3:417–427.
- Brown, W. C., A. C. Rice-Ficht, and D. M. Estes. 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63:45–55.
- Bruno, R. G. S., H. M. Rutigliano, R. L. Cerri, P. H. Robinson, and J. E. P. Santos. 2009. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:175–186.
- Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. International Feed Resources Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.
- De Ondarza, M. B., C. J. Sniffen, L. Dussert, E. Chevaux, J. SULLIVAN, Pas, N. Walker. 2010. Case study: Multiple study analysis of the effect of live yeast on

milk yield, milk component content and yield and feed efficiency. *Prof. Anim. Sci.* 26:661–666.

- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620–1632.
- DeVries, T. J., and E. Chevaux. 2014. Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. *J. Dairy Sci.* 97:6499–6510.
- Dias, J. D. L., R. B. Silva, T. Fernandes, E. F. Barbosa, L. E. C. Graças, R. C. Araujo, R. A. N. Pereira, and M. N. Pereira. 2018. Yeast culture increased plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and feed efficiency of dairy cows in a hot environment. *J. Dairy Sci.* 101:5924–5936.
- Durand-Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, M. Théveniot, and P. Gouet. 1998. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:275–280.
- Favoretto, S. R., M. L. Carrieri, M. S. Tino, C. R. Zanetti, and O. A. C. Pereira. 1993. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 35:171–175.
- Hall, M. B. 2009. Determination of starch, included maltooligosaccharides, in animal feeds: Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *J. AOAC Int.* 92:42–49.
- Huber, J. T., G. Higginbotham, R. A. Gomez-Alarcon, R. B. Taylor, K. H. Chen, S. C. Chan, Z. Wu. 1994. Heat stress interactions with protein, supplemental fat, and fungal cultures. *J. Dairy Sci.* 77:2080–2090.

- Izcue, A., J. L. Coombes, and F. Powrie. 2006. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 212:256–271.
- Jacob, J., and A. Pescatore. 2017. Glucans and the poultry immune system. *Am. J. Immunol.* 13:45–49.
- Jiang, Y., I. M. Ogunade, S. Qi, T. J. Hackmann, C. R. Staples, A. T. Adesogan. 2017. Effects of the dose and viability of *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Diversity of ruminal microbes as analyzed by Illumina MiSeq sequencing and quantitative PCR. *J. Dairy Sci.* 100:325–342.
- Lee, S.S., F. M. Robinson, and H. Y. Wang. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11:641–649.
- Li, S., I. Yoon, M. Scott, E. Khafipour, and J. C. Plaizier. 2015. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and subacute ruminal acidosis on production, inflammation, and fermentation in the rumen and hindgut of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 211:50–60.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216–1231.
- Liu, J., G. Ye, Y. Zhou, Y. Liu, L. Zhao, Y. Liu, X. Chen, D. Huang, S. F. Liao, and K. Huang. 2014. Feeding glycerol-enriched yeast culture improves performance, energy status, and heat shock protein gene expression of lactating Holstein cows under heat stress. *J. Anim. Sci.* 92:2494–2502.
- Marden, J. P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon, and C. Bayourthe. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.* 91:3528–3535.

- National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, X. B. Chen, F.M. McIntosh. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811–1818.
- Nocek, J. E., M. G. Holt, and J. Oppy. 2011. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:4046–4056.
- Oliveira, B. M. L., L. L. Bitencourt, J. R. M. Silva, G. S. Dias Júnior, I. C. C. Branco, R. A. N. Pereira, and M. N. Pereira. 2010. Supplementation of dairy cows with *Saccharomyces cerevisiae* strain KA500. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62:1174–1182.
- Pinloche, E., N. McEwan, J. P. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair, and C. J. Newbold. 2013. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PLoS ONE* 8:e67824.
- Poppy, G. D., A. R. Rabiee, I. J. Lean, W. K. Sanchez, K. L. Dorton, and P. S. Morley. 2012. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:6027–6041.
- Rainard, P., and C. Riollet. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369-400.
- Salvati, G. G. S., N. N. Morais Júnior, A. C. S. Melo, R. R. Vilela, F. F. Cardoso, M. Aronovich, R. A. N. Pereira, and M. N. Pereira. 2015. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. *J. Dairy Sci.* 98:4062–4073.

- Schleger, A. V., and H. G. Turner. 1965. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. *Aust. J. Agric. Res.* 16:92–106.
- Schwartz, G., M. L. Rhoads, M.J. VanBaale, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of a supplemental yeast culture on heat-stressed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92:935–942.
- Toledo, M. Z., G. M. Baez, A. Garcia-Guerra, N. E. Lobos, J. N. Guenther, E. Trevisol, D. Luchini, R. D. Shaver, and M. C. Wiltbank. 2017. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. *PLoS ONE* 12:e0189117.
- Trckova, M., M. Faldyna, P. Alexa, Z. Sramkova Zajacova, E. Gopfert, D. Kumprechtova, E. Auclair, and R. D’Inca. 2014. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 92:767–774.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Yousef, M. K. 1985. *Stress physiology in livestock*. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Yuan, K., L.G.D. Mendonça, L.E. Hulbert, L.K. Mamedova, M.B. Muckey, Y. Shen, C. C. Elrod, and B.J. Bradford. 2015. Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:3236–3246.

Zaworski, E.M., N. A. Fadden, W. K. Sanchez, I. Yoon, and G. Bobe. 2014. Effects of feeding various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:3081–3098.

Table 1. Temperature-Humidity Index (THI), temperature ($^{\circ}\text{C}$), and humidity (%) at the center of the tie stall

Item	Entire experiment ¹	Week 7 ²
THI \geq 68, % of time	86.4	98.5
THI \geq 72, % of time	45.6	56.8
THI mean	72.9	73.7
THI maximum	86.3	83.6
THI minimum	63.8	66.8
Temperature mean	24.4	24.7
Temperature maximum	36.5	34.0
Temperature minimum	17.0	19.0
Humidity mean	80.0	84.7
Humidity maximum	99.0	98.5
Humidity minimum	36.5	50.0

¹2688 recordings at 30-min intervals.

²Week 7 of measurement of total tract apparent digestibility of nutrients (336 recordings).

Table 2. Concentration of viable and non-viable yeast cells in products containing strains NCYC 996 and SC 47 on d 21 and d 56 of the experiment

	Viable cells/g	Non-viable cells/g	Total cells/g
NCYC 996			
Day 21	1.89×10^{10}	0.96×10^{10}	2.85×10^{10}
Day 56	1.63×10^{10}	0.91×10^{10}	2.54×10^{10}
Mean	1.76×10^{10}	0.93×10^{10}	2.70×10^{10}
SC 47			
Day 21	1.23×10^{10}	0.86×10^{10}	2.09×10^{10}
Day 56	0.78×10^{10}	1.21×10^{10}	1.99×10^{10}
Mean	1.00×10^{10}	1.03×10^{10}	2.04×10^{10}

Table 3. Composition of the diets (% of DM) on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996
Ingredients			
Corn silage	42.7	42.7	42.7
Alfafa haylage	4.3	4.3	4.3
Soybean meal (46.0% CP)	12.3	12.3	12.3
SoypassBR Cargill (48.3% CP)	3.5	3.5	3.5
Whole cottonseed	11.3	11.3	11.3
Citrus pulp	10.9	10.9	10.9
Rehydrated and ensiled corn grain	13.0	13.0	13.0
Limestone	0.7	0.7	0.7
Sodium bicarbonate	0.5	0.5	0.5
Magnesium oxide	0.3	0.3	0.3
Salt	0.1	0.1	0.1
Minerals and vitamins ¹	0.4	0.4	0.4
Nutrients			
CP	15.7	15.5	15.3
NDF	37.1	37.7	37.3
Forage NDF	23.9	23.8	23.9
Starch	21.9	21.9	21.9
Ether extract	6.8	6.7	6.2
Ash	6.0	6.1	6.3
NFC ²	34.4	34.0	34.9
DM, % of as fed	42.3	42.4	42.1

¹20.0% Ca, 15.6% P, 3.1% Mg, 3.5% S, 100 ppm Co, 2,000 ppm Cu, 5,000 ppm Mn, 12,000 ppm Zn, 82 ppm Se, 200 ppm I, 1,000 KIU/kg Vit. A, 220 KIU/kg Vit. D, 6,200 IU/kg Vit. E

²NFC = 100 - (CP + NDF + Ether extract + Ash)

Table 4. Intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, and Linear SCC on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹				
					Treat	Week	Treat×Week	C1	C2
DMI, kg/d	19.3	19.4	19.5	0.48	0.85	< 0.01	0.89	0.62	0.79
Milk, kg/d	35.6	36.1	35.7	0.88	0.85	< 0.01	0.43	0.69	0.69
ECM, kg/d	31.9	31.5	31.3	1.25	0.89	< 0.01	0.60	0.66	0.88
4% FCM, kg/d	30.7	30.4	30.3	1.08	0.92	< 0.01	0.56	0.70	0.93
Fat, kg/d	0.973	0.950	0.936	0.0330	0.62	< 0.01	0.32	0.34	0.72
Fat, %	3.16	3.05	3.08	0.073	0.40	< 0.01	0.65	0.58	0.65
Protein, kg/d	1.065	1.046	1.032	0.0325	0.64	< 0.01	0.13	0.37	0.69
Protein, %	3.08	3.04	3.09	0.059	0.63	< 0.01	0.95	0.95	0.36
Lactose, kg/d	1.564	1.614	1.537	0.0399	0.24	< 0.01	0.99	0.82	0.09
Lactose, %	4.49	4.52	4.51	0.023	0.45	< 0.01	0.12	0.84	0.71
Solids, kg/d	4.100	4.155	3.997	0.1048	0.38	< 0.01	0.99	0.57	0.18
Solids, %	11.78	11.66	11.72	0.314	0.58	< 0.01	0.61	0.87	0.63
MUN, mg/dL	17.9	16.6	17.5	0.63	0.18	< 0.01	0.19	0.19	0.18
Milk/DMI	1.84	1.87	1.82	0.028	0.32	< 0.01	0.67	0.73	0.16
ECM/DMI	1.65	1.64	1.61	0.032	0.66	< 0.01	0.73	0.49	0.56
BW, kg	630	622	624	5.0	0.32	< 0.01	0.43	0.15	0.68
BW gain, kg/d	0.476	0.347	0.329	0.3824	0.92			0.70	0.96
BCS, 1 to 5	2.71	2.70	2.71	0.078	0.99	0.02	0.70	0.89	0.96
Linear SCC, ² 1 to 9	4.94	4.17	4.37	0.178	< 0.01	0.07	0.59	< 0.01	0.40

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

²Equivalency of the SCC scores. 4.94 = 384,000 cells/mL, 4.17 = 225,000 cells/mL, and 4.37 = 258,000 cells/mL.

Table 5. Rectal temperature and respiration rate measured twice per week at 0700, 1300, and 1900 h, sweating rate measured once per week at 1500 h, and plasma niacin concentration at 1300 h on d 14 and d 56 on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹				
					Treat	Day	Treat×Day	C1	C2
Rectal temperature, °C									
0700 h	38.6	38.7	38.6	0.07	0.50	<0.01	0.27	0.92	0.24
1300 h	39.2	39.1	39.0	0.08	0.38	<0.01	0.77	0.30	0.35
1900 h	39.3	39.4	39.1	0.13	0.14	<0.01	0.23	0.72	0.06
Respiration, breaths/min									
0700 h	45.7	46.9	43.2	3.86	0.64	<0.01	0.87	0.87	0.36
1300 h	67.8	64.4	62.0	6.61	0.67	<0.01	0.49	0.49	0.71
1900 h	57.2	56.2	50.6	6.05	0.51	<0.01	0.48	0.48	0.36
Sweating rate, g/m ² /h									
1500 h	206	237	186	58.3	0.60	<0.01	0.44	0.81	0.32
Niacin d 14, µg/mL	1.22	1.32	1.35	0.077	0.45			0.67	0.78
Niacin d 56, µg/mL	1.58	1.57	1.55	0.056	0.84			0.62	0.77

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

Table 6. Proportion of cow observations (% N = 160/treatment) with rectal temperature $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ at 0700, 1300, and 1900 h on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	Treatment			CTL vs. SC 47			CTL vs. NCYC 996			Odds ratio	95 % CI ³	
	CTL	SC 47	NCYC 996	Est ¹	SE ²	P-value	Est ¹	SE ²	P-value			
0700 h	10.0	11.2	13.1	0.13	0.363	0.72	0.30	0.352	0.38	0.84	0.42	1.64
1300 h	48.1	47.5	37.5	- 0.02	0.223	0.91	- 0.43	0.227	0.05	1.51	0.96	2.35
1900 h	58.1	58.7	41.8	0.02	0.226	0.91	- 0.65	0.226	< 0.01	1.98	1.26	3.08

¹Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero.

²Standard error of the estimate.

³Profile likelihood 95 % confidence interval for odds ratio.

Table 7. Urinary allantoin excretion, total-tract apparent digestibility of nutrients, digestible OM intake (DOMI), and the ratio of ECM to DOMI on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹		
					Treat	C1	C2
Allantoin, mmol/d	176.1	203.9	171.8	22.31	0.47	0.63	0.28
Allantoin/DOMI, mmol/kg	14.1	15.6	14.9	1.49	0.76	0.55	0.74
Digestibility, % of intake							
DM	67.4	67.0	64.2	1.71	0.39	0.39	0.27
OM	70.4	70.5	67.8	1.43	0.34	0.47	0.20
NDF	48.3	50.9	46.4	2.67	0.52	0.43	0.27
Non-NDF OM	84.1	84.5	83.4	0.95	0.71	0.86	0.42
DOMI, kg/d	12.7	12.8	12.6	0.63	0.37	0.66	0.24
ECM/DOMI	2.50	2.43	2.69	0.119	0.33	0.66	0.16

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

Table 8. Plasma glucose concentration 0, 2, 4, and 12 h post-feeding on weeks 2, 4, 6, and 8 and plasma urea-N (PUN) 0, 2, and 4 h post-feeding on weeks 4 and 8 on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹				
					Treat	Week	Treat×Week	C1	C2
Glucose, mg/dL									
0 h	63.5	63.3	63.2	1.65	0.99	< 0.01	0.53	0.91	0.98
2 h	56.9	56.5	58.6	1.50	0.87	< 0.01	0.99	0.84	0.62
4 h	57.6	58.9	59.5	1.34	0.60	< 0.01	0.93	0.34	0.76
12 h	59.1	62.4	60.3	1.94	0.35	< 0.01	0.30	0.25	0.36
PUN, mg/dL									
0 h	12.7	12.9	13.5	0.61	0.61	< 0.01	0.82	0.47	0.49
2 h	13.9	13.8	14.9	0.87	0.44	< 0.01	0.58	0.59	0.62
4 h	13.2	14.1	14.8	0.79	0.23	< 0.01	0.95	0.12	0.42

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

Table 9. Dry matter intake on d 42 during the evaluation of chewing activity and ingestion behavior on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹		
					Treat	C1	C2
DMI, kg/d	19.3	19.4	19.5	0.48	0.85	0.62	0.79
Ingestion, min/d	246	300	307	17.6	0.05	0.02	0.77
Rumination, min/d	460	448	453	22.3	0.90	0.69	0.85
Chewing, min/d	704	749	759	25.2	0.22	0.08	0.74
Ingestion, min/kg DMI	13.3	15.9	16.2	0.82	0.05	< 0.01	0.76
Rumination, min/kg DMI	24.6	24.1	24.1	1.23	0.94	0.73	0.99
Chewing, min/kg DMI	37.9	40.1	40.4	1.37	0.38	0.16	0.86
First meal duration, min	25.7	31.9	29.7	3.47	0.43	0.23	0.63
Meal duration, min	27.1	32.2	31.1	1.42	0.04	0.01	0.58
Meals/d	9.1	9.3	10.0	0.47	0.38	0.35	0.30

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

Table 10. Proportion of daily intake in periods of the day and particle size sorting behavior on d 45 on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹		
					Treat	C1	C2
0700 to 1300 h, % of daily intake	53.1	53.6	53.3	1.43	0.96	0.84	0.87
1300 to 1900 h, % of daily intake	29.2	26.0	28.7	3.88	0.67	0.55	0.51
1900 to 0700 h, % of daily intake	17.7	19.6	17.4	1.92	0.50	0.62	0.29
Sorting, Observed/Predicted, ² %							
0700 to 1300 h							
> 19 mm ³	129.9	136.1	120.9	10.41	0.54	0.90	0.27
> 8 mm < 19 mm ³	98.9	98.2	98.6	1.12	0.85	0.66	0.72
< 8 mm ³	97.6	99.2	99.4	1.67	0.71	0.41	0.93
1300 to 1900 h							
> 19 mm	97.7	110.8	105.2	7.69	0.49	0.28	0.61
> 8 mm < 19 mm	111.9	99.0	101.1	6.63	0.35	0.16	0.82
< 8 mm	99.7	101.6	100.8	2.62	0.87	0.64	0.82
1900 to 0700 h							
> 19 mm	97.5	90.2	117.5	7.13	0.03	0.45	0.01
> 8 mm < 19 mm	99.4	105.2	99.7	2.80	0.27	0.37	0.17
< 8 mm	110.8	101.7	99.7	5.59	0.34	0.16	0.80

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

²< 100% = rejection, > 100% = preferential intake, = 100% = no selection

³Diameter of sieves of the Penn State Particle Separator

Table 11. Complete hemogram at the day before vaccination (Day - 1) and on days 7 and 15 after vaccination on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996. The rabies vaccination was performed on d 36 of the comparison period

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	<i>P</i> -value ¹		
					Treat	C1	C2
Erythrocytes, $\times 10^6/\mu\text{L}$							
Day - 1	5.59	5.64	5.86	0.141	0.38	0.37	0.28
Day 7	5.74	5.81	5.99	0.225	0.70	0.54	0.56
Day 15	5.79	5.73	5.95	0.176	0.64	0.80	0.37
Hemoglobin, g/dL							
Day -1	8.33	8.73	8.83	0.228	0.26	0.16	0.75
Day 7	8.49	8.92	9.00	0.291	0.41	0.19	0.84
Day 15	8.78	8.85	9.00	0.224	0.78	0.60	0.64
Hematocrit, %							
Day - 1	24.44	25.01	25.79	0.627	0.30	0.21	0.36
Day 7	24.89	25.51	26.10	0.783	0.54	0.33	0.58
Day 15	25.66	25.52	26.14	0.522	0.63	0.78	0.37
Mean corpuscular volume, fL							
Day - 1	43.67	44.38	44.22	0.858	0.80	0.52	0.88
Day 7	43.72	43.77	43.87	0.796	0.98	0.90	0.92
Day 15	44.61	44.50	44.47	0.910	0.99	0.90	0.98
Mean corpuscular hemoglobin (MCH), pg							
Day - 1	14.84	15.45	15.08	0.331	0.44	0.31	0.44
Day 7	14.83	15.21	15.10	0.247	0.46	0.22	0.71
Day 15	15.17	15.42	15.23	0.363	0.88	0.73	0.71
MCH concentration, g/dL							
Day - 1	34.07	34.91	34.30	0.393	0.39	0.29	0.32
Day 7	33.97	34.78	34.44	0.278	0.14	0.16	0.38
Day 15	34.18	34.72	34.38	0.393	0.60	0.44	0.52
Red cell distribution width, %							
Day - 1	18.52	19.68	19.62	0.422	0.10	0.16	0.92

Day 7	19.69	19.74	19.82	0.685	0.99	0.91	0.93
Day 15	19.41	19.76	19.52	0.759	0.94	0.80	0.82
Leukocytes, $\times 10^3/\mu\text{L}$							
Day - 1	17.96	14.17	17.88	2.744	0.30	0.72	0.19
Day 7	17.63	18.11	19.43	2.001	0.85	0.72	0.70
Day 15	19.78	18.66	19.27	2.793	0.92	0.74	0.83
Lymphocytes, $\times 10^2/\mu\text{L}$							
Day - 1	72.91	73.49	80.28	2.951	0.19	0.31	0.13
Day 7	69.55	67.21	64.31	3.967	0.68	0.50	0.63
Day 15	70.50	68.00	64.00	3.563	0.20	0.16	0.27
Monocytes, $\times 10^2/\mu\text{L}$							
Day - 1	3.40	2.79	1.49	0.568	0.04	0.08	0.04
Day 7	2.70	2.20	2.20	0.634	0.81	0.52	0.99
Day 15	3.00	2.50	5.30	0.893	0.07	0.42	0.03
Eosinophils, $\times 10^2/\mu\text{L}$							
Day - 1	4.49	3.34	3.00	0.727	0.35	0.18	0.73
Day 7	2.83	2.59	2.87	0.571	0.94	0.88	0.74
Day 15	2.79	1.66	2.88	0.722	0.15	0.11	0.23
Platelets, $\times 10^3/\mu\text{L}$							
Day - 1	275	329	297	22.1	0.23	0.20	0.30
Day 7	333	267	318	26.5	0.20	0.23	0.19
Day 15	216	259	219	27.2	0.47	0.50	0.31

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

Table 12. Titer of rabies antibodies and serum cytokines at the day before vaccination (Day - 1) and on days 7, 15, and 23 after vaccination on treatments Control (CTL) and yeast strains SC 47 and NCYC 996. The rabies vaccination was performed on d 36 of the comparison period

	CTL	SC 47	NCYC 996	SEM	Treat	<i>P</i> -value ¹	
						C1	C2
Antibodies, IU/mL							
Day - 1	5.6	18.1	12.5	7.68	0.52	0.31	0.61
Day 7	54.9	41.6	37.5	20.30	0.81	0.54	0.88
Day 23	49.9	40.7	34.5	20.87	0.87	0.63	0.83
Mean ²	36.3	33.4	27.3	18.04	0.88	0.71	0.74
Interleukin-4, pg/mL							
Day - 1	214	213	238	11.4	0.21	0.43	0.12
Day 7	800	781	913	66.5	0.32	0.57	0.17
Day 15	822	888	713	54.5	0.09	0.76	0.03
Mean ³	612	627	621	28.9	0.93	0.06	0.81
Interferon gamma, pg/mL							
Day - 1	861	862	946	59.6	0.51	0.56	0.32
Day 7	459	452	468	16.3	0.79	0.95	0.50
Day 15	501	495	515	10.7	0.40	0.75	0.19
Mean ⁴	608	602	643	22.1	0.34	0.59	0.25

¹C1 = CTL vs. (SC 47 + NCYC 996). C2 = SC 47 vs. NCYC 996.

² $P < 0.01$ for Day and $P = 0.57$ for the interaction of Treatment and Day.

³ $P < 0.01$ for Day and $P = 0.05$ for the interaction of Treatment and Day.

⁴ $P < 0.01$ for Day and $P = 0.73$ for the interaction of Treatment and Day.

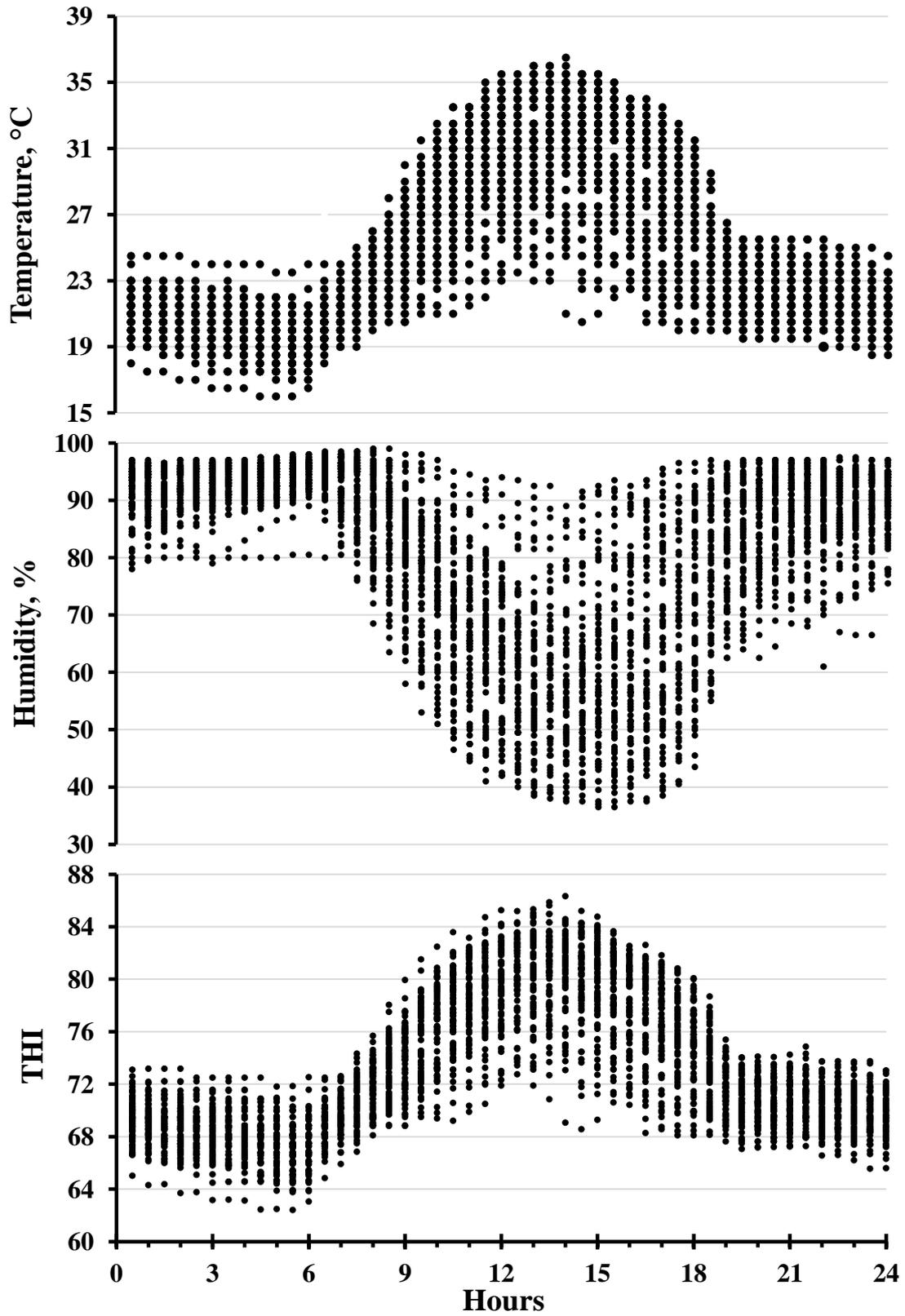


Figure 1. Temperature, humidity, and Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall during the 56-d comparison period. 2688 recordings at 30-min intervals.