



LETÍCIA DO NASCIMENTO RESENDE

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SUPLEMENTAÇÃO
COM BACTÉRIAS E LEVEDURAS**

**LAVRAS-MG
2019**

LETÍCIA DO NASCIMENTO RESENDE

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SUPLEMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS E
LEVEDURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

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

Resende, Letícia do Nascimento.

Resposta de vacas leiteiras à suplementação com bactérias e
leveduras / Letícia do Nascimento Resende. - 2019.

88 p.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Fermentação ruminal. 2. Temperatura corporal. 3.
Imunidade. I. Pereira, Marcos Neves. II. Título.

LETÍCIA DO NASCIMENTO RESENDE

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SUPLEMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS E
LEVEDURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de março de 2019.

Dr. Marcos Neves Pereira – UFLA

Dr^a. Carla Luiza da Silva Ávila – UFLA

Dr^a. Renata Apocalypse Nogueira Pereira – EPAMIG

Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

Aos meus pais, avós e irmãos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Geraldo e Sueli, por todo apoio sempre.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcos Neves Pereira, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela paciência e dedicação.

À Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira, pela atenção e ajuda ao longo desse período.

As professoras Dra. Carla Luiza da Silva Ávila e Dra. Ana Paula Peconick, pelas contribuições no trabalho.

Ao Grupo do Leite pelos conhecimentos, pela colaboração e pelo acolhimento.

Aos amigos de pós-graduação, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da Fazenda São Francisco e do Laboratório de Pesquisa Animal/DZO pela disposição e colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e aos departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela oportunidade.

A todos que fizeram parte dessa trajetória e torceram por mim.

RESUMO

Avaliou-se o efeito de um aditivo líquido contendo uma combinação de microrganismos viáveis de bactérias lácticas, bactérias formadoras de esporos e leveduras (*S. cerevisiae*) cultivadas em consórcio (CBL; Global Saúde, Brasil/SCD Probiotics, EUA) sobre a digestão, o consumo, o desempenho na lactação, a temperatura corporal e a resposta imune de vacas leiteiras. Vinte e seis vacas Holandesas (185 ± 141 dias em lactação) foram alimentadas individualmente com uma dieta de padronização por 14 dias e os tratamentos Controle ou CBL (3,5 mL/kg de matéria seca da dieta total) por 56 dias, em um delineamento em blocos casualizados ajustado para covariável e com estrutura de medidas repetidas ao longo do tempo. O CBL aumentou o consumo de matéria seca (CMS. 23,5 vs. 22,5 kg/d. $P < 0,01$) e tendeu a aumentar a produção de leite (30,0 vs. 29,4 kg/d. $P = 0,06$) e lactose (+ 60 g/d. $P = 0,09$). O leite corrigido para energia/CMS foi reduzido pelo CBL (1,25 vs. 1,31. $P = 0,02$). A concentração de sólidos no leite e o rendimento não diferiram ($P \geq 0,28$). As vacas alimentadas com CBL tenderam a ter maiores valores de ECC (3,02 vs. 2,91. $P = 0,08$), mas o PV não diferiu (641 kg, $P = 0,27$). O CBL tendeu a reduzir a digestibilidade do trato total da MO não-fibrosa (81,2 vs. 84,1%. $P = 0,08$) enquanto que as digestibilidades do amido (90,7%) e FDN (48,4%) não diferiram ($P \geq 0,20$). A proporção molar de butirato no líquido ruminal tendeu a ser reduzida por CBL (9,4 vs. 10,4%. $P = 0,06$) assim como a concentração total de protozoários ($P = 0,10$). A relação acetato/propionato (3,1. $P = 0,89$) e a produção microbiana do rúmen estimada pela excreção urinária diária de alantoína ($P = 0,21$) não diferiram. O CBL reduziu a proporção de consumo diário de manhã (35,1 vs. 40,4%. $P = 0,02$), aumentou a proporção no período da tarde (45,9 vs. 41,9%. $P = 0,03$). Comportamentos de ruminância e ingestão não diferiram ($P \geq 0,16$). O CBL reduziu o N-ureico no sangue às 09:00 h (21,2 vs. 25,1 mg/dL. $P = 0,01$) e tendeu a reduzir em 16:30 h (20,1 vs. 23,1 mg/dL. $P = 0,06$) e 23:00 h (17,9 vs. 20,6 mg/dL, $P = 0,09$), mas não afetou a N-ureico do leite (18,6 mg/dL, $P = 0,47$). O aumento da produção de leite e do CMS induzidos por CBL foram associados ao aumento da temperatura corporal. As temperaturas retais foram aumentadas pelo CBL às 09:00 h (38,3 vs. 38,1°C. $P < 0,01$), 15:30 h (38,8 vs. 38,5°C. $P = 0,01$) e 22:00 h (38,5 vs. 38,2°C. $P = 0,02$). A frequência de vacas com temperatura retal $\geq 39,2^\circ\text{C}$ às 15:30 h foi de 18,2% no CBL e 6,3% no CTL ($P < 0,01$). A temperatura da pele tendeu a ser aumentada por CBL às 09:00 h (34,1 vs. 33,8°C. $P = 0,10$) e foi aumentada às 22:00 h (35,1 vs. 34,7°C. $P = 0,02$). A sudorese nas semanas 4 (90,4 vs. 66,9 g/m²/h. $P = 0,05$) e 5 (103,9 vs. 72,1 g/m²/h. $P = 0,01$) foi aumentada pelo CBL. O tempo gasto deitado foi reduzido pelo CBL (742 vs. 813 min/d. $P = 0,04$). A taxa respiratória não diferiu ($P \geq 0,34$). A imunidade em resposta a uma vacina contra vírus/leptospirose no d 36 (D0) foi avaliada. A interleucina-4 no soro tendeu a ser reduzida por CBL no D0 (779 vs. 859 pg/mL. $P = 0,10$) e não diferiu nos dias 7 (D7) e 14 (D14) relativamente à vacinação ($P \geq 0,26$). A interleucina-12 foi reduzida por CBL em D7 (611 vs. 709 pg/mL, $P = 0,02$), mas não diferiu no D0 e D14 ($P \geq 0,27$). Interferon gama e interleucina-10 não diferiram ($P \geq 0,20$). Em D0, a concentração de monócitos como proporção de leucócitos tendeu a ser aumentada por CBL (3,8 vs. 5,7%. $P = 0,10$). A CCS do leite foi aumentada pela CBL (49.500 vs. 67.000 células/mL. $P = 0,03$). O CBL induziu maior aumento no CMS do que na produção de leite, diminuindo a eficiência alimentar, e teve efeitos menores na digestibilidade e no perfil de fermentação ruminal. O aumento do CMS e da produção de leite induzida pelo CBL foi associado ao aumento da

temperatura corporal e da sudorese, pequenas alterações nos marcadores de imunidade e aumento do CCS do leite de vacas com baixa CCS.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas. Fermentação ruminal. Imunidade. Levedura. Probiótico.

ABSTRACT

The effect of a liquid additive containing a combination of viable microorganisms of lactic acid bacteria, spore forming bacteria and yeasts (*S. cerevisiae*) grown in a consortium (CBL; Global Health, Brazil/SCD Probiotics, USA) on the digestion, consumption, lactation performance, body temperature and the immune response of dairy cows. Twenty-six Holstein cows (185 ± 141 lactating days) were fed individually with a standardized diet for 14 days and Control or CBL treatments (3.5 mL/kg dry matter total diet) for 56 d, in a covariate adjusted randomized block design with repeated measures over time. The CBL increased DMI (23.5 vs 22.5 kg/d. $P < 0.01$) and tended to increase the yields of milk (30.0 vs 29.4 kg/d. $P = 0.06$) and lactose (+ 60 g/d. $P = 0.09$). Energy-corrected milk/DMI was reduced by CBL (1.25 vs 1.31. $P = 0.02$). Milk solids concentration and yield did not differ ($P \geq 0.28$). Cows fed CBL tended to have higher BCS (3.02 vs 2.91. $P = 0.08$), but BW did not differ (641 kg. $P = 0.27$). The CBL tended to reduce the total tract digestibility of the non-fibrous OM (81.2 vs 84.1%. $P = 0.08$) whereas starch (90.7%) and NDF (48.4%) digestibilities did not differ ($P \geq 0.20$). Molar proportion of butyrate in ruminal fluid tended to be reduced by CBL (9.4 vs 10.4%, $P = 0.06$) as well as total protozoa concentration ($P = 0.10$). The acetate to propionate ratio (3.1. $P = 0.89$) and the ruminal microbial yield estimated by the daily urinary allantoin excretion ($P = 0.21$) did not differ. The CBL reduced the proportion of daily intake in the morning (35.1 vs 40.4%. $P = 0.02$), increased the proportion in the afternoon (45.9 vs 41.9%. $P = 0.03$). Rumination and ingestion behaviors did not differ ($P \geq 0.16$). The CBL reduced blood urea-N at 0900 h (21.2 vs 25.1 mg/dL. $P = 0.01$) and tended to reduce at 1630 h (20.1 vs 23.1 mg/dL. $P = 0.06$) and 2300 h (17.9 vs 20.6 mg/dL. $P = 0.09$), but did not affect milk urea-N (18.6 mg/dL. $P = 0.47$). The increase in milk yield and DMI induced by CBL was associated to increased body temperature. Rectal temperatures were increased by CBL at 0900 h (38.3 vs 38.1°C. $P < 0.01$), 1530 h (38.8 vs 38.5°C. $P = 0.01$), and 2200 h (38.5 vs 38.2°C. $P = 0.02$). The frequency of cows with rectal temperature $> 39.2^\circ\text{C}$ at 1530 h was 18.2% on CBL and 6.3% on CTL ($P < 0.01$). Skin temperature tended to be increased by CBL at 0900 h (34.1 vs 33.8°C. $P = 0.10$) and was increased at 2200 h (35.1 vs 34.7°C. $P = 0.02$). Sweating rates in weeks 4 (90.4 vs 66.9 g/m²/h. $P = 0.05$) and 5 (103.9 vs 72.1 g/m²/h. $P = 0.01$) were increased by CBL. Time spent laying down was reduced by CBL (742 vs 813 min/d. $P = 0.04$). Respiratory rate did not differ ($P \geq 0.34$). Immunity in response to a virus/leptospirosis vaccine on d 36 (D0) was evaluated. Interleukin 4 in serum tended to be reduced by CBL on D0 (779 vs 859 pg/mL. $P = 0.10$) and did not differ on days 7 (D7) and 14 (D14) relative to vaccination ($P \geq 0.26$). Interleukin 12 was reduced by CBL on D7 (611 vs 709 pg/mL. $P = 0.02$), but did not differ on D0 and D14 ($P \geq 0.27$). Interferon gamma and Interleukin 10 did not differ ($P \geq 0.20$). At D0, the concentration of monocytes as a proportion of leukocytes tended to be increased by CBL (3.8 vs 5.7%. $P = 0.10$). Milk SCC was increased by CBL (49,500 vs 67,000 cells/mL. $P = 0.03$). The CBL induced a greater increase in DMI than in milk yield, decreasing feed efficiency, and had minor effects on digestibility and ruminal fermentation profile. The increase in DMI and milk yield induced by CBL was associated to increased body temperature and sweating rate, minor alterations in immunity markers, and increased milk SCC of cows with low SCC.

Keywords: Somatic cell count. Ruminal fermentation. Immunity. Yeast. Probiotic.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1. Índice de Temperatura-Umididade (ITU) durante o experimento. 2688 registros com intervalos de 30-min. Média \pm desvio padrão: ITU: $66,8 \pm 4,79$; temperatura: $19,7 \pm 4,1^\circ\text{C}$; umidade: $82,7 \pm 11,8\%$. Proporção de ITU > 68: 37,2% do tempo.....59

Figura 2. Produção de leite (Leite) nos tratamentos Controle (---○---) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (---●---). $P = 0,06$ para efeito fixo de tratamento, $P < 0,01$ para efeito fixo de dia e $P = 0,72$ para interação entre tratamento e dia. Covariável (cv): $P = 0,60$. Opção *Slice* do SAS: $^aP \leq 0,05$, $^bP \leq 0,10$ e $^cP \leq 0,15$65

Figura 3. Consumo de matéria seca (CMS) nos tratamentos Controle (---○---) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (---●---). $P < 0,01$ para efeito fixo de tratamento, $P < 0,01$ para efeito fixo de dia e $P = 0,88$ para interação entre tratamento e dia. Covariável (cv): $P = 0,50$. Opção *Slice* do SAS: $^aP \leq 0,05$, $^bP \leq 0,10$ e $^cP \leq 0,15$65

Figura 4. Concentração de nitrogênio no plasma (NUP) nos tratamentos Controle (---○---) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (---●---). Setas: 0700, 1430 e 2100 h imediatamente pós ordenha, 0900, 1630 e 2300 h duas horas após a ordenha Valor médio \pm erro padrão da média: Controle ($22,1 \pm 0,78$) e Consórcio de Bactérias e Leveduras ($20,1 \pm 0,82$). $P = 0,08$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de hora e $P = 0,14$ para interação entre tratamento e hora. Opção *Slice* do SAS: $^aP = 0,01$, $^bP = 0,06$ e $^cP = 0,09$67

Artigo 2

Figura 1. Contagem de células somáticas linear (CCS linear) nos tratamentos Controle (---○---) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (---●---). Média \pm Erro padrão das médias: Controle ($1,99 \pm 0,148$) e Consórcio de Bactérias e Leveduras ($2,42 \pm 0,156$). Equivalência do escore linear: $1,99 = 49.500$ células/mL e $2,42 = 67.000$ células/mL. $P = 0,03$ para efeito fixo de tratamento, $P < 0,01$ para efeito fixo de semana e $P = 0,71$ para interação entre tratamento e semana. Opção *Slice* do SAS: $^aP \leq 0,05$, $^bP = 0,10$ e $^cP = 0,13$79

Figura 2. Tempo de decúbito das vacas nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL). $P = 0,04$ para efeito fixo de tratamento.....80

Figura 3. Sudorese nos tratamentos Controle (■) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (■) às 16:00 h. Valor médio \pm EPM: Controle ($77,11 \pm 3,669$ g/m²/h) e Consórcio de Bactérias e Leveduras ($84,39 \pm 3,819$ g/m²/h). $P = 0,17$ para efeito fixo de tratamento; $P = 0,09$ para efeito fixo de semana e $P = 0,07$ para interação tratamento e semana. $^aP = 0,05$, $^bP = 0,01$80

Figura 4. Concentração de glicose no plasma nos tratamentos Controle (■) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (■). Média \pm Erro padrão da média: Controle ($65,8 \pm 1,81$ mg/dL) e Consórcio de Bactérias e Leveduras ($67,4 \pm 1,89$ mg/dL). $P = 0,59$ para efeito fixo de tratamento, $P < 0,01$ para efeito fixo de semana e $P = 0,85$ para interação entre tratamento e semana.....81

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Composição da dieta experimental em ingredientes e nutrientes (% da matéria seca) e distribuição do tamanho de partículas (% da matéria natural) nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).....61

Tabela 2. Consumo de matéria seca (CMS), desempenho leiteiro, contagem de células somáticas (CCS), nitrogênio ureico no leite (NUL), escore de condição corporal (ECC) e peso vivo (PV) nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL)....64

Tabela 3. Digestibilidade aparente no trato digestivo total (% do consumido) da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), fibra em detergente neutro (DFDN), matéria orgânica não FDN (DMO não-FDN) e amido (DAmido), excreção de alantoína na urina e viscosidade fecal nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).....65

Tabela 4. Proporção molar de ácidos graxos voláteis (% do total) e concentração de protozoários no fluido ruminal nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).....66

Tabela 5. Comportamento de ingestão e ruminação e proporção do consumo ao longo do dia nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).....66

Tabela 6. Comportamento de seleção de partículas, de amido e de fibra em detergente neutro (FDN) (observado/predito, %) e sobra como proporção do oferecido em períodos do dia nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).....67

Artigo 2

Tabela 1. Temperaturas retal e da pele e frequência respiratória nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).....79

Tabela 2. Proporção de vacas com temperatura retal $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ às 0900 h, 1530 h e 2200 h nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL). Observações/tratamento: CTL = 208 e CBL = 192.....80

Tabela 3. Concentração de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos antes da vacinação (Dia 0) e 7 dias pós-vacinação (Dia 7) nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL). Vacinação no dia 36 do período experimental.....81

Tabela 4. Concentração de plaquetas, leucócitos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e segmentados antes da vacinação (Dia 0) e 7 dias pós-vacinação (Dia 7) nos tratamentos Controle (CTL) Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL). Vacinação no dia 36 do período experimental.....82

Tabela 5. Concentração de citocinas séricas antes da vacinação (Dia 0) e nos dias 7 (Dia 7) e 14 (Dia 14) pós-vacinação nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL). Vacinação no dia 36 do período experimental.....82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Definição de probióticos	16
2.2	Microrganismos comumente utilizados como probióticos.....	17
2.3	Mecanismos de ação dos probióticos	17
2.4	Bactérias ácido-láticas	19
2.4.1	Resposta animal à suplementação com bactérias ácido-láticas.....	20
2.4.2	Produção de bacteriocinas	23
2.4.3	Resposta imune à suplementação com bactérias ácido-láticas.....	24
2.5	Bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	26
2.5.1	Resposta animal à suplementação com <i>Bacillus</i>	26
2.5.2	Resposta imune à suplementação com <i>Bacillus</i>	28
2.6	Leveduras	29
2.6.1	Resposta animal à suplementação com leveduras	30
2.6.2	Resposta imune à suplementação com leveduras	33
2.7	Comportamento alimentar e seleção de partículas	35
2.8	Termorregulação	37
2.9	Balanço ácido-básico do sangue	38
2.10	Imunidade	39
2.10.1	Imunidade da glândula mamária.....	42
	REFERÊNCIAS.....	45
	Suplementação de vacas leiteiras com bactérias e leveduras. I. Desempenho leiteiro, consumo e digestão	56
	Suplementação de vacas leiteiras com bactérias e leveduras. II. Termorregulação e imunidade	73

1 INTRODUÇÃO

Aditivos alimentares são insumos usados na nutrição animal com o intuito de aumentar a qualidade da dieta consumida, o desempenho zootécnico, a saúde do animal e gerar um produto final de melhor qualidade. Aditivos alimentares requerem validação científica que demonstre sua eficácia e a impossibilidade de efeito danoso à saúde humana e animal e ao ambiente (YIRGA, 2015). Microrganismos vivos ou inativos e seus produtos metabólicos e meio de cultivo são alguns tipos de aditivos zootécnicos capazes de atuar como promotores da digestão de nutrientes, via mecanismo ruminal, e/ou manipuladores do crescimento de microrganismos no trato digestivo, principalmente no intestino de animais monogástricos ou ruminantes lactantes (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008; SEO et al., 2010). Além da possibilidade de ação positiva sobre a digestão ou sobre a prevalência de distúrbios metabólicos oriundos do trato digestivo, como a acidose ruminal ou o crescimento de microrganismos patogênicos no intestino, tem sido evidenciado que esta classe de aditivos alimentares também tem ação sistêmica por atuação sobre a termorregulação e a imunidade (SALVATI et al., 2015; DIAS et al., 2018; SILVA, 2018). Compreender o mecanismo de ação dos aditivos e a repetibilidade da resposta animal é importante para definir a probabilidade de eficácia do produto em cenários produtivos distintos e consequentemente a possibilidade de resultar em benefício financeiro ao produtor.

Produtos à base de microrganismos (bactérias e leveduras) com ação comprovada em monogástricos, bezerros ou humanos podem também atuar de forma benéfica em ruminantes funcionais. A microbiota ruminal pode interagir com microrganismos fornecidos diretamente (*Direct-fed microbials*) ou seus produtos metabólicos. Os microrganismos podem afetar positivamente a função ruminal, auxiliando no controle da acidose láctica (NOCEK et al., 2002), aumentando a digestibilidade da fibra e a síntese ruminal de niacina (SALVATI et al., 2015; DIAS et al., 2018). A niacina é capaz de induzir vasodilatação periférica e aumentar a perda evaporativa de calor pelo animal (ZIMBELMAN; BAUMGARD; COLLIER., 2010). Por este mecanismo de ação, leveduras podem induzir ganho na eficiência alimentar (leite/consumo), por redução na exigência nutricional para manutenção da homeotermia. Este efeito positivo sobre a eficiência alimentar é de magnitude similar ao observado para o ionóforo monensina que atua reduzindo a perda energética como metano ruminal. Desta forma, aditivos microbianos podem atuar positivamente sobre a eficiência da produção animal de forma coerente à tendência naturalista do consumidor de produtos de origem animal.

Glucanos presentes na parede celular de leveduras, como as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, podem estimular a imunidade do animal por contato com a mucosa do trato digestivo

(ZAWORSKI et al., 2014), auxiliando no controle da mastite e da contagem de células somáticas do leite e de outras infecções que reduzem a longevidade de vacas leiteiras. Entretanto, a alta capacidade do rúmen de degradar carboidratos pode resultar em baixa proporção da parede celular ingerida tendo atuação sobre a mucosa do trato digestivo inferior, como ocorre em monogástricos. Leveduras vivas e resistentes à fermentação ruminal podem ser mais efetivas no estímulo imunológico pós-ruminal em ruminantes funcionais, pois poderiam suprir mais glucanos ao intestino que produtos baseados em leveduras inativas, autolisadas ou rompidas, teoricamente degradáveis no rúmen. Bactérias produtoras de esporos, como cepas de *Bacillus subtilis*, também têm sido utilizadas como imunomoduladores em animais de produção e humanos. A combinação de microrganismos poderia ser adotada visando a produção de aditivos microbianos multi-funcionais.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma mistura de bactérias e leveduras cultivadas em consórcio sobre o desempenho leiteiro, a digestão, a termorregulação e a imunidade de vacas leiteiras em lactação. Nossa hipótese foi a de que os microrganismos suplementados pela dieta atuariam positivamente sobre o desempenho leiteiro, a digestibilidade e a imunidade e reduziriam a temperatura corporal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição de probióticos

A definição mais amplamente aceita para o termo probiótico é de que são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). O termo probiótico tem sido usado para descrever vários tipos de produtos contendo microrganismos viáveis ou não em forma pura ou juntos do meio de cultura utilizado para o cultivo industrial, preparações de enzimas ou combinações destes produtos. Para evitar confusões devido às diversas definições do termo, em 1989 a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos exigiu que os fabricantes usassem o termo “Direct-Fed Microbial” (DFM. Microrganismos Fornecido Diretamente). A definição de DFM de acordo com a FDA é "uma fonte de microrganismos vivos de ocorrência natural".

Para ser usado como probiótico, é essencial que os organismos sejam considerados como GRAS (Generally Recognized As Safe - Geralmente Reconhecido como Seguro). Holzapfel et al. (1998) e Gaggia et al. (2010) definiram alguns critérios microbiológicos para o probiótico ser considerado eficaz. Estes critérios incluem não ser patogênico, sobreviver e ser metabolicamente ativo no trato gastrointestinal, ser capaz de aderir e competir com outros microrganismos, ser antagonista a bactérias patogênicas, possuir capacidade de exercer algum efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro, ser geneticamente estável e viável em altas populações e ter especificidade para o hospedeiro. Os benefícios providos pelos probióticos são cepa-específicos e não espécie ou gênero-específicos (FIGUEROA-GONZALEZ et al., 2011). Krehbiel et al. (2003) observaram que o uso de cepas não específicas para os hospedeiros pode ser a razão pela qual não ocorra resposta ao uso de probiótico bacteriano.

O cultivo dos microrganismos em escala industrial é requerido para a fabricação dos produtos comerciais. As cepas também devem ser adaptadas a um veículo adequado ou substrato fermentável. O produto final deve garantir a ação dos microrganismos dentro de um prazo de validade pré-determinado. As cepas probióticas que se afirmam presentes em um produto devem ser estáveis o suficiente para suportar os processamentos da produção comercial e distribuição (KHAN; NAZ, 2013) e também devem resistir ao calor utilizado no processamento industrial de alguns alimentos (como na peletização). Em adição, devem permanecer viáveis em número suficientemente alto e reter a atividade metabólica mesmo além da data de validade (HOLZAPFEL et al., 1998).

2.2 Microrganismos comumente utilizados como probióticos

Os produtos baseados em probióticos podem compreender apenas uma espécie de microrganismo ou podem conter várias espécies e cepas em uma mistura. A utilização de misturas pode atingir condições de ação mais amplas em diferentes espécies de animais (FULLER, 1989). Adicionalmente, pode ocorrer efeito sinérgico entre os microrganismos, o que pode potencializar o mecanismo de ação do produto (CALLAWAY et al., 2008).

Os probióticos utilizados em nutrição animal podem ser separados em três classes: bacterianos, fúngicos ou uma combinação de ambos. Os microrganismos mais comumente utilizados incluem *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), bactérias utilizadoras de ácido láctico e microrganismos formadores de esporos (GAGGIA et al., 2010; SEO et al., 2010). Os aditivos nutricionais contendo probióticos variam quanto a composição, dose e forma de oferta aos animais, o que explica parte da variabilidade na resposta animal aos diferentes produtos.

Bactérias usadas em produtos probióticos para ruminantes geralmente incluem espécies de *Lactobacillus* (NOCEK et al., 2002; ZHANG et al. 2016), *Enterococcus* (NOCEK et al., 2002; BEAUCHEMIN et al., 2003), *Bacillus* (QIAO et al., 2010; ZHANG et al. 2016); e *Propionibacterium* (FRANCISCO et al., 2002; RAETH-KNIGHT et al., 2007). Outras espécies bacterianas de origem ruminal, como *Megasphaera elsdenii* e *Prevotella bryantii*, podem ser usadas como probióticos para estabilizar ou melhorar a função ruminal (CHIQUELLE et al., 2008; SEO et al., 2010). Bactérias formadoras de esporos têm a vantagem de serem resistentes ao manuseio na fazenda e a práticas de processamento de grãos em fábricas de rações (CUTTING, 2011), além de serem resistentes à digestão ácida no abomaso de bovinos sendo, portanto, capazes de ter ação intestinal (SANDERS et al., 2003). Contudo, os probióticos à base de leveduras têm sido os mais amplamente utilizados em ruminantes para reduzir o acúmulo de ácido láctico e estabilizar o pH ruminal, ajudar na termorregulação em ambientes de alta temperatura, melhorar a digestibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, obter maior desempenho leiteiro ou eficiência alimentar (DESNOYERS et al., 2009; MOALLEM et al., 2009; SALVATI et al., 2015).

2.3 Mecanismos de ação dos probióticos

Os modos de ação dos probióticos ainda não são totalmente elucidados, embora vários mecanismos possíveis tenham sido propostos. Microrganismos com ação intestinal podem modificar a microbiota do trato digestivo inferior, visto que algumas bactérias produzem bacteriocinas (LINDGREN; DOBROGOSZ, 1990; OH; KIM; WOROBO, 2000; SYNGAI et

al., 2016) e competem com patógenos pelos locais de aderência na superfície intestinal, o que as torna capazes de prevenir a aderência ou ativação desses patógenos e, assim, facilitam sua remoção (GILL, 2003). Os probióticos podem ainda influenciar a permeabilidade do intestino e modular a função imunológica (HOLZAPFEL et al., 1998; PUNIYA et al., 2015).

O principal mecanismo de ação relatado é chamado de exclusão competitiva, que se refere à capacidade dos microrganismos probióticos de bloquear ou reduzir o crescimento de bactérias patogênicas. Este bloqueio pode ocorrer com a alteração do pH intestinal, com produção de ácidos orgânicos, como o ácido acético e o ácido lático, criando um ambiente impróprio para potenciais patógenos (BROWN, 2011; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; GOUDARZI et al., 2014).

Outros modos de ação incluem o bloqueio de sítios de ativação, quando as bactérias são estabelecidas no intestino se ligam à superfície do epitélio intestinal, impedindo a ligação de patógenos oportunistas (FULLER, 1989; COLLINS; GIBSON, 1999; KREHBIEL et al., 2003; GOUDARZI et al., 2014); a competição com patógenos por nutrientes e fontes de energia para proliferação (BROWN, 2011); produção de substâncias seletivas no intestino, como arginina, glutamina, ácidos graxos de cadeia curta e ácidos linoleicos conjugados (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; HEMAISWARYA et al., 2013).

Probióticos ainda podem melhorar a função e a manutenção de barreira intestinal, que é essencial para a saúde do hospedeiro. Danos na integridade da barreira podem resultar em várias doenças intestinais e infecções por patógenos e ainda podem levar a uma exposição das células do sistema imunológico da mucosa ao conteúdo do lúmen, como antígenos da microflora intestinal, ocasionando uma resposta imune irregular (O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010). Em condições fisiológicas normais, a função da barreira intestinal é mantida por diversos fatores que estão inter-relacionados, incluindo secreção de muco, cloreto e secreção de água, e ligação de células epiteliais (NG et al., 2009).

Existem dois mecanismos pelos quais se pode melhorar a função da barreira intestinal, através da secreção de muco e da expressão de genes envolvidos na sinalização de junção de oclusão. O muco é composto de mucinas intestinais (MUC 2 e MUC 3) que são secretadas pelas células caliciformes do epitélio, que irão fornecer proteção contra patógenos, enzimas, toxinas, desidratação e abrasão. *Lactobacillus plantarum* 299v e *Lactobacillus rhamnosus* GG mostraram regular positivamente a produção de mucinas intestinais que inibem a aderência da bactéria enteropatogênica *Escherichia coli* O157:H7 às células epiteliais do intestino. Alguns probióticos, como os lactobacilos, modulam a regulação de vários genes que codificam proteínas de junção de oclusão (SYNGAI et al., 2016).

A capacidade de modular a função imunológica é outro mecanismo que garante a melhora na saúde do hospedeiro. Após a administração do probiótico, eles são absorvidos pelas células epiteliais intestinais via transcitose e são engolfados por macrófagos ou células dendríticas, que eventualmente desencadeiam uma resposta imune (DICKS; BOTES, 2010). Potenciais patógenos podem ser eliminados após a exposição aos probióticos (YIRGA, 2015). Segundo Elghandour et al. (2015) diversas cepas de LAB são capazes de ativar macrófagos para a produção de citocinas que estimulam a resposta imune.

Os probióticos podem se enquadrar em duas categorias principais: aqueles que são imunostimulatórios, caracterizados por sua capacidade de induzir interleucina-12 (IL-12) e, portanto, aumentar a defesa do hospedeiro através do aumento da atividade das células NK e vias Th1, e aqueles que são imunorregulatórios caracterizados pela capacidade de induzir interleucina-10 (IL-10) e a via reguladora de células T. Em geral, os lactobacilos são imunostimuladores, enquanto os bifidobactérias imunorreguladores (YAQOOB, 2014).

Além dos potenciais efeitos benéficos sobre o trato digestivo pós-ruminal, certos probióticos ainda são capazes de promover benefícios no rúmen. Bactérias produtoras de ácido láctico, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*, podem afetar positivamente o rúmen pelo estímulo de bactérias utilizadoras de ácido láctico evitando a acidose ruminal em vacas leiteiras (NOCEK et al., 2002). As leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), que são os probióticos mais extensivamente utilizados na alimentação de vacas leiteiras, também são capazes de prevenir o excesso de ácido láctico no rúmen, pelo estímulo de bactérias utilizadoras de lactato, estabilizando o pH, além de alterar os produtos da fermentação ruminal, estimular microrganismos degradadores de fibra e melhorar a digestibilidade (PINLOCHE et al. 2013). As bactérias que utilizam o lactato foram propostas como probióticos por serem capazes de diminuir as concentrações de lactato e, portanto, conseguem estabilizar o pH ruminal.

2.4 Bactérias ácido-láticas

Alguns produtos probióticos contêm bactérias ácido-láticas, como *Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium sp*, *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp* e *Pediococcus sp* (MCALLISTER et al., 2011; KLEIN et al., 1998). Os gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* são constituintes da microbiota no trato gastrointestinal normal de humanos e animais (FISHER; PHILLIP, 2009). As BAL são bactérias anaeróbias, não-formadoras de esporos, tolerantes a ácidos e que produzem os ácidos láctico, principalmente, e acético como produto final da fermentação de açúcares. As bifidobactérias produzem os ácidos acético e láctico na proporção de 3:2 e, por isso,

podem ser mais efetivas no controle de patógenos gram-negativos no trato gastrointestinal em comparação com lactobacilos (DICKS; BOTES, 2010).

Em uma análise da composição da comunidade bacteriana fecal de bezerros, Uyeno, Sekiguchi e Kamagata (2010) detectaram *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*, porém as populações diminuíram conforme a idade e esses grupos não foram mais detectados nas amostras dos animais com 3 meses de idade, isto provavelmente ocorre devido ao desenvolvimento fisiológico do trato gastrointestinal e à composição da dieta (BUNEŠOVÁ et al., 2015). Portanto as bifidobactérias são capazes de passar pelo TGI de bezerros, porém para alcançar um efeito probiótico seria necessária a administração de doses frequentes para favorecer o estabelecimento desses microrganismos em animais em sistema de produção intensivo.

2.4.1 Resposta animal à suplementação com bactérias ácido-láticas

Krehbiel et al. (2003) resumiram cinco experimentos, publicados como resumos, em que foram utilizados probióticos bacterianos, contendo bactérias ácido-láticas ou combinações contendo uma mistura de bactérias e leveduras, na alimentação de vacas leiteiras em lactação, para avaliar o consumo e desempenho leiteiro. Foi possível observar que o aumento da produção de leite é uma resposta consistente, enquanto que os resultados na composição do leite e no consumo de matéria seca (CMS) variam. Gomez-Basauri, Ondarza e Siciliano-Jones (2001) avaliaram o efeito de um suplemento contendo *L. acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus (Streptococcus) faecium* (bactéria láctica total = 10^9 UFC/g) e mananoligossacarídeo (Bio-Mos, Alltech, Inc, Nicholasville, KY) em vacas leiteiras em lactação (39,2 kg/d e 154 DEL). Vacas alimentadas com bactérias ácido-láticas e mananoligossacarídeo consumiram 0,42 kg/d ($P < 0,03$) a menos de matéria seca (MS) e produziram mais leite (39,57 vs. 38,84 kg/d; $P < 0,06$) comparado ao grupo Controle. Estes resultados sugerem que suplementar probióticos bacterianos em combinação com mananoligossacarídeo pode ser eficaz para aumentar o desempenho de vacas em lactação.

Oetzel et al. (2007) realizaram um experimento em fazenda comercial para avaliar o desempenho de vacas leiteiras nos períodos pré- e pós-parto. Os tratamentos foram placebo ou probiótico (Probios TC, Chr. Hansen, Milwaukee, WI) contendo *Enterococcus faecium* (5×10^9 UFC) + *Saccharomyces cerevisiae* (5×10^9 UFC) administrados a vacas com 10 dias antes do parto até 23 dias após o parto. Não observaram nenhum efeito significativo do probiótico sobre a produção média e máxima de leite, o pico de lactação, os componentes do leite e sobre o CMS. Foram observadas diferenças apenas quando foram avaliadas vacas de primeira e

segunda ou maior lactação. O percentual de gordura no leite foi maior ($P < 0,10$) para as vacas de primeira lactação que receberam o produto e o percentual de proteína do leite foi maior para vacas de segunda ou maior lactação ($P < 0,03$). No entanto, Nocek et al. (2003) realizaram um estudo com 64 vacas holandesas multíparas usando a mesma combinação de probióticos oferecidos a partir de 3 semanas antes do parto até 10 semanas após o parto e observaram um aumento do consumo de matéria seca, aumento da produção de leite e de proteína no leite durante os primeiros 21 dias de lactação.

Nocek e Kautz (2006) avaliaram o efeito de um probiótico em dietas para vacas leiteiras durante o período de transição (21 ± 3 d antes da data prevista de parto até 10 semanas pós-parto). Foram utilizadas quarenta e quatro vacas holandesas que foram alocadas aos tratamentos controle (sem suplementação) ou 2 g de probiótico/vaca/d (Probios TC, Chr. Hansen, Milwaukee, WI), contendo 2×10^9 UFC de levedura e 5×10^9 UFC de *Enterococcus faecium* em ambos períodos. O CMS de vacas suplementadas com o probiótico tendeu a ser 1,0 kg/d maior durante o pré-parto ($P < 0,10$). No pós-parto as vacas suplementadas com probiótico consumiram 2,7 kg/d de MS a mais ($P < 0,01$) e a produção de leite foi maior para as vacas que receberam probiótico em comparação com as vacas controle (39,2 kg/d vs. 36,9 kg/d; $P < 0,01$). O teor de gordura do leite foi menor para as vacas que receberam probiótico em comparação com o controle (4,44 vs. 4,76 %; $P < 0,01$), enquanto que a produção de gordura não foi afetada. Não houve efeito do tratamento sobre o teor de proteína do leite, entretanto a produção de proteína foi numericamente maior para as vacas que receberam probiótico (1,20 vs. 1,14; $P > 0,10$). Não houve efeito de tratamento sobre a CCS ou N-ureico do leite. As vacas suplementadas com probiótico apresentaram maior teor de lactose no leite em comparação com o controle (4,65 vs. 4,59 %; $P < 0,05$). Não houve efeito de tratamento sobre o PV ou escore de condição corporal no pré- e no pós-parto. Durante o período pré-parto, a glicose no sangue foi semelhante entre os tratamentos, da mesma forma que 1 dia pós-parto, também não houve diferenças significativas. No entanto, no d 7 as vacas que receberam o probiótico apresentaram maior glicose ($P < 0,05$), comparado ao grupo controle. O aumento da glicose no sangue foi seguido pelo aumento da concentração de lactose no leite e da produção de leite.

A suplementação com *Enterococcus faecium*, utilizada individualmente ou em combinação com levedura foi avaliada em bovinos de corte em comparação a um grupo controle (BEAUCHEMIN et al., 2003). Foram utilizados oito novilhos canulados. As bactérias (*E. faecium* EF212) e leveduras foram misturadas com carbonato de cálcio para fornecer 6×10^8 UFC de bactérias/g (6×10^9 UFC/d) e 6×10^8 UFC de levedura/g (6×10^9 UFC/d) fornecidas uma vez por dia no momento da alimentação (10 g/d/novilho). O CMS e o ganho médio diário

não foram afetados pelo tratamento. Os novilhos que receberam apenas *E. faecium* apresentaram maior PV comparado ao controle (525 vs. 519 kg; $P < 0,05$). O pH mínimo foi menor para os novilhos que receberam *E. faecium* do que no controle (5,03 vs. 5,15; $P < 0,05$), entretanto a média não diferiu estatisticamente. A concentração de propionato foi maior (33,1 vs. 25,4 mol/100 mol; $P < 0,05$) e a concentração de butirato tendeu a ser menor para os novilhos suplementados com *E. faecium* (13,1 vs. 16,1 mol/100 mol; $P < 0,10$). Enquanto que a combinação *E. faecium* + levedura teve menor concentração de isobutirato (0,90 vs. 1,04 mol/100 mol; $P < 0,05$) comparado ao controle. O tratamento não influenciou a digestibilidade da MS ou do amido. No entanto, a utilização de *Enterococcus faecium* tendeu ($P < 0,10$) a diminuir a digestibilidade da matéria orgânica (MO) no trato total e a digestão intestinal da fibra em detergente neutro (FDN). Os autores sugeriram que a menor digestão da fibra por novilhos suplementados com *E. faecium* pode estar associada ao menor pH ruminal observado.

Raeth-Knight et al. (2007) realizaram um experimento com inicialmente trinta e nove vacas holandesas multíparas e 18 primíparas lactantes. Posteriormente duas vacas foram removidas do tratamento 1; uma vaca por causa de mastite severa e uma por morte. Uma vaca foi removida do tratamento 2 devido a mastite severa e uma foi removida do controle por morte, porém os autores não associaram aos tratamentos. As vacas foram alocadas a 1 dos 3 tratamentos: 1) 1×10^9 UFC/d de *L. acidophilus* cepa LA747 e 2×10^9 UFC/d de *P. freudenreichii* cepa PF24; 2) 1×10^9 UFC/d de *L. acidophilus* cepa LA747, 2×10^9 UFC/d de *P. freudenreichii* cepa PF24 e 5×10^8 UFC/d de *L. acidophilus* cepa LA45; ou 3) lactose (controle). Os tratamentos foram preparados misturando 45 g de milho finamente moído com 5 g do produto probiótico (Nutrition Physiology Corp., Indianapolis, IN) ou lactose. Os tratamentos foram armazenados a -30 °C até o fornecimento e foram administrados 1 x/d por 84 d. Foram avaliados o desempenho na lactação, a digestibilidade dos nutrientes e a fermentação ruminal. Não foram observados resultados benéficos sobre a produção e a composição do leite ou sobre o CMS. Também não teve efeito significativo sobre o pH, a proporção molar de ácidos graxos voláteis (AGV) e a concentração de amônia no rúmen. As digestibilidades aparentes da MS, FDN, PB e amido foram semelhantes entre os tratamentos, não tendo resposta à suplementação dos probióticos.

Ghorbani et al. (2002) realizaram um experimento com suplementação de probióticos bacterianos com seis novilhos canulados no rúmen (média de 670 kg de peso vivo), confinados em dieta de alto grão à base de cevada, em delineamento quadrado latino 3×3 replicado. A duração de cada período foi de 3 semanas, com uma adaptação de 2 semanas e um período de mensuração de 1 semana. Os novilhos receberam um dos seguintes tratamentos: 1) controle, 2)

Propionibacterium P15 (P15), e 3) *Propionibacterium* P15 + *Enterococcus faecium* EF212 (PE). Os tratamentos bacterianos (10^9 UFC/g) e controle (concentrado proteico), foram fornecidos como top-dress uma vez por dia no momento da alimentação (10 g/boi/d). O consumo de matéria seca e o pH ruminal, que foi medido por eletrodo (média, mínima, horas e área de $\text{pH} < 5,8$ ou $< 5,5$) não foram afetados pelo tratamento ($P > 0,05$). A contagem total de protozoários para os novilhos alimentados com *Propionibacterium* foi significativamente maior e o número de bactérias amilolíticas foi menor ($P < 0,05$) daqueles alimentados com *Propionibacterium* + *E. faecium* ou Controle. Os números mais altos de protozoários também podem ter contribuído para o aumento da concentração de butirato observados em novilhos alimentados com *Propionibacterium* comparado aos do grupo Controle (14,06 vs. 13,02 %; $P < 0,05$), uma vez que protozoários tendem a aumentar as proporções de butirato (KLOPFENSTEIN; PURSER; TYZNIK, 1966). Entretanto, o mecanismo pelo qual probióticos podem estimular o número de protozoários no rúmen ainda não está claro. O aumento da população de protozoários aparentemente resultou na diminuição na população de bactérias que utilizam amido. Os protozoários demonstram atividade predatória contra bactérias do rúmen. Além disso, os protozoários englobam as partículas de amido juntamente com a população bacteriana associada, o que limita o substrato para as bactérias que o utilizam e o número de bactérias amilolíticas no conteúdo ruminal.

2.4.2 Produção de bacteriocinas

Cotter et al. (2005) observaram que muitas bactérias ácido lácticas produzem peptídeos inibidores que incluem, principalmente, lantibióticos (classe I), que são antibióticos contendo lantionina, bacteriocinas peptídicas (classe II) e bacteriolisinas (classe III). Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos de baixo peso molecular que podem ter espectro de ação amplo ou restrito. Bacteriocinas produzidas por LAB podem variar de espectro, mas geralmente, a atividade é contra espécies gram-positivas. A atividade contra gram-negativas foi demonstrada, mas ocorre apenas em situações em que a integridade da membrana externa foi comprometida. Bacteriocinas produzidas por LAB incluem lactacina B de *L. acidophilus*, plantaricina de *L. plantarum* e nisina de *Lactococcus lactis*, que apresentam efeito inibitório sobre a produção de amônia por algumas bactérias. *Lactobacillus reuteri* produzem a reuterina, que possui atividade de amplo espectro contra uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus, e pode ser diferencialmente expressa por diversas cepas (BROWN, 2011). Holzapfel et al. (1995) ainda sugeriram que LAB produzem peróxido de hidrogênio, o que efetivamente inibe *S. aureus* e *Pseudomonas spp.* Os mecanismos comuns de destruição de células alvo por

bacteriocinas incluem a formação de poros, possibilitando a perda de componentes citoplasmáticos e/ou a inibição da síntese de parede celular (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

2.4.3 Resposta imune à suplementação com bactérias ácido-láticas

A administração de probióticos pode modular a imunidade inata e adaptativa. Gill et al. (2000) avaliaram o efeito da suplementação de *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) e *Bifidobacterium lactis* (HN019), comparado a um grupo controle, em camundongos saudáveis. A suplementação dos probióticos foi capaz de aumentar indicadores de imunidade inata e adquirida, aumentando significativamente a atividade fagocítica de leucócitos e macrófagos e as respostas de anticorpos séricos a antígenos administrados via oral (toxina da cólera) ou sistemicamente (vacina contra tétano) em camundongos saudáveis. Portanto, o uso de probióticos pode facilitar e aumentar a duração das vacinas, o que torna plausível dizer que melhora a resposta imune, porém podem ocorrer resultados controversos, já que as respostas imunes às vacinas podem ser afetadas por outros fatores, principalmente em animais de rebanho, que são expostos a variáveis não controladas, como, por exemplo, infecções subclínicas.

Perdigón et al. (1999) estudaram o efeito de BAL sobre as células imunes associadas à mucosa em camundongos utilizando diversas cepas bacterianas (*L. casei* CRL 431, *L. acidophilus* CRL 924, *L. plantarum* CRL 936, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CRL 423, *L. rhamnosus* CRL 74, *L. lactis* CRL 526 e *S. salivarius* ssp. *thermophilus* CRL 412) fornecidas por 2, 5 ou 7 d consecutivos a uma dose de 10^9 células/d. Os autores relataram que o BAL pode interagir em diferentes níveis no intestino delgado, estimulando a imunidade da mucosa e aumentando a produção de anticorpos, porém os efeitos são dependente da cepa e da dose. Portanto, a imunoestimulação da mucosa pela BAL não é semelhante para todas as espécies bacterianas.

Em um estudo realizado por Elam et al. (2003) foram utilizados 240 bovinos (peso vivo inicial = 332,8 kg) para determinar os efeitos de *Lactobacillus acidophilus* (LA) + *Propionibacterium freudenreichii* (PF) sobre o desempenho e carcaça, características intestinais, concentrações séricas de IgA e a prevalência de *Escherichia coli* O157. Os animais foram divididos em 12 baias de 20 animais, foi feito um delineamento de blocos inteiramente casualizados e os tratamentos foram: 1) controle apenas com lactose (CON); 2) 1×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de LA NP51 + 1×10^6 UFC de LA NP45 + 1×10^9 UFC de NP24 de PF/animal/dia (LA45-51H); 3) 1×10^9 UFC de LA NP51 + 1×10^9 UFC de NP24 de PF/animal/dia (LA51); e 4) 1×10^6 UFC de LA NP51 + 1×10^6 UFC de LA NP45 + 1×10^9

UFC de PF NP24/animal/dia (LA45-51L). Os tratamentos eram armazenados em freezer e, posteriormente, reconstituído em água destilada e então era misturado a dieta. No abate, amostras de tecido intestinal de diferentes partes do íleo foram obtidas de um animal selecionado aleatoriamente de cada baia. A espessura da lâmina própria foi medida no nível das criptas e áreas glandulares intermediárias. Estes mesmos animais selecionados também foram utilizados para a medição das concentrações séricas de IgA. Amostras de fezes foram coletadas de cada novilho 7 d antes do abate e imediatamente antes do transporte para o abatedouro para determinar a prevalência de *E. coli* O157. Nenhuma diferença ($P > 0,10$) foi detectada para dados de desempenho e carcaça. A porcentagem de novilhos que tiveram *E. coli* O157, 7 d antes e no dia do embarque para o abate, diferiu ($P \leq 0,10$) entre os tratamentos. Os resultados indicaram que os novilhos LA51 apresentaram menor ($P \leq 0,10$) prevalência de *E. coli* O157 que os novilhos CON e LA45-51L. Segundo os autores essa redução de *E. coli* O157 pode ser associada à ação antimicrobiana dos *Lactobacillus*. Não houve diferenças entre os tratamentos para as concentrações séricas de IgA e para as medidas da lâmina própria retiradas das secções ileais mais próximas do jejuno. No entanto, os novilhos tratados com LA45-51H e LA51 tenderam ter uma lâmina própria mais fina que os novilhos no tratamento CON ($P = 0,08$). Além disso, o contraste para CON vs. a média dos outros tratamentos demonstrou que os novilhos que receberam alguma forma de probiótico tinham uma lâmina própria mais fina ($P = 0,03$). Segundo os autores, uma lâmina própria mais fina pode resultar em uma absorção de nutrientes mais eficiente e, assim, o desempenho pode ser melhorado. Adicionalmente com a redução da *E. coli* O157, ocorre uma diminuição no gasto de energia para regeneração do tecido gastrointestinal danificado como resultado da inflamação induzida pelo patógeno. Contudo, nesse estudo as culturas vivas de LA e PF não afetaram de forma efetiva o desempenho em confinamento.

Daudelin et al. (2011) realizaram um estudo com probiótico contendo *P. acidilactici*, *S. cerevisiae boulardii* ou uma combinação de ambos para suínos e foi feito um desafio com o patógeno *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). A infecção por ETEC causa diarreia em leitões no pós-desmame. A suplementação da combinação de *P. acidilactici* e *S. cerevisiae* durante o desafio ETEC resultou em um aumento de IL-6 no tecido ileal quando comparado com suínos do grupo controle. A suplementação com apenas *P. acidilactici* também indicou uma tendência para aumentar as concentrações de IL-6 em comparação com os suínos do grupo controle. Ocorreu ainda uma tendência de aumento da expressão de TNF-alfa em suínos suplementados com a combinação de *P. acidilactici* e *S. cerevisiae* e aumento da expressão de IL-12 e do peptídeo antimicrobiano β -defensina com *P. acidilactici* quando comparado com o

controle, entretanto não houve efeito do tratamento no interferon-gamma, IL-10 ou IL-8. Portanto, *P. acidilactici* pode ser utilizado para melhorar a saúde intestinal e reduzir o uso de antibióticos devido seu potencial para modular as funções imunes intestinais em leitões.

2.5 Bactérias do gênero *Bacillus*

Bacillus são bactérias gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas e são as principais bactérias formadoras de esporos utilizadas como probiótico. De todas as espécies de *Bacillus* apenas algumas são utilizadas como probióticos em humanos e animais, incluindo *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* (CUTTING 2011; FIJAN 2014).

Produtos com bactérias capazes de formar esporos permitem o armazenamento por longo prazo sem ocorrer perda de viabilidade, em comparação com aqueles que contêm bactérias não-formadoras de esporos. Além disso, os esporos são resistentes ao calor e ao frio, apresentando alta estabilidade no processamento de alimentos e são capazes de sobreviver ao baixo pH da barreira gástrica e alcançam o intestino delgado para exercer suas propriedades probióticas (CUTTING, 2011; SANDERS et al., 2003).

Os mecanismos de ação ainda são desconhecidos, mas acredita-se que a os esporos das bactérias tornam-se ativos no trato gastrointestinal do hospedeiro, proliferam e colonizam o intestino (SANDERS et al., 2003; HONG et al., 2005).

2.5.1 Resposta animal à suplementação com *Bacillus*

Bacillus subtilis é um microrganismo transitório do trato digestivo e não patogênico. A população de *Bacillus subtilis* no trato digestivo é reduzida após o término da suplementação (SANDERS et al., 2003), por esta razão, a suplementação dietética de *Bacillus subtilis* deve ser realizada diariamente. Souza et al. (2017) realizaram dois experimentos para avaliar a suplementação de vacas leiteiras com esporos viáveis de *Bacillus subtilis*. No experimento 1 foram utilizadas dezoito vacas holandesas, com 246 ± 75 dias em lactação (DEL), $29,7 \pm 5,8$ kg/d de produção de leite e com contagem de células somáticas (CCS) abaixo de 100.000 células/mL no início do experimento. As vacas foram blocadas com base na paridade e na produção de leite e foram distribuídas em uma sequência de dois tratamentos em delineamento crossover, com períodos de 39 dias. Os tratamentos foram 0,3 g/d de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* (cepa C-3102; Calpis Co. Ltd., Tóquio, Japão) em carbonato de cálcio, para proporcionar um consumo diário de $3,0 \times 10^9$ UFC, ou Placebo (carbonato de cálcio). As cápsulas de gelatina foram preenchidas com os tratamentos para a dosagem oral diária de cada vaca após a ordenha matinal. A suplementação de *Bacillus subtilis* não teve efeito detectável

sobre a ingestão, a produção de leite e seus componentes e a eficiência alimentar. Também não houve diferença na atividade mastigatória e na digestibilidade aparente do trato total dos nutrientes. O experimento 2 foi realizado em uma fazenda leiteira comercial. O rebanho foi escolhido para representar um cenário de alta CCS. Trinta vacas holandesas com 161 ± 72 DEL no início do experimento foram blocadas com base na CCS e produção de leite e foram aleatoriamente alocadas a um dos dois tratamentos do experimento 1 durante 16 semanas. Nesse experimento a dose diária de cada tratamento foi misturada com milho moído e oferecida como top-dress pela manhã. A média de CCS foi de 716.000 células/mL para o tratamento *Bacillus subtilis* e 734.000 células/mL para Placebo, e a produção de leite foi de 29,6 e 29,9 kg/d, respectivamente. Nesse segundo experimento, a suplementação de vacas leiteiras com esporos de *Bacillus subtilis* aumentou a produção de leite, proteína e sólidos totais ($P < 0,05$). A resposta positiva da produção de leite foi detectada após 5 semanas de suplementação e foi consistente da semana 7 a 16. O probiótico aumentou a secreção de energia do leite ($P = 0,02$), mas não teve efeito sobre a produção de gordura e lactose ($P > 0,35$) e tendeu a reduzir a concentração de N-ureico no leite ($P = 0,06$). O tratamento não alterou a CCS do leite em nenhum dos experimentos, assim como o peso vivo e ECC.

Sun, Wang e Deng (2013) investigaram o efeito do *Bacillus subtilis natto* (10 g/dia contendo $0,5 \times 10^{11}$ UFC ou 20 g/d contendo 1×10^{11} UFC) sobre o desempenho de vacas leiteiras no início da lactação. Houve um aumento linear da produção de leite para as vacas suplementadas com *B. subtilis* (25,2 e 26,4 vs. 23,0 kg/d do grupo Controle), leite corrigido para 4 % de gordura, leite corrigido para energia, produção de gordura, de proteína e de lactose e uma redução da CCS no leite (5,06 e 4,95 vs. 5,24 \log_{10}/mL) para os grupos tratados em comparação com o grupo Controle.

Em outro estudo, vacas em lactação foram suplementadas com *B. licheniformis* e *B. subtilis* separadamente (QIAO et al., 2010). As culturas continham 2×10^9 células vivas/g e as vacas nos grupos de tratamento receberam 100 g de cultura de *Bacillus* na forma de top-dress duas vezes ao dia. As vacas suplementadas com *B. licheniformis* aumentaram a produção de leite corrigido para 4 % de gordura (26,9 kg/d), quando comparadas com as vacas que receberam *B. subtilis* (24,2 kg/d) e controle (24,8 kg/d). A suplementação com *B. licheniformis* aumentou o teor de proteína no leite (3,09 %) comparado ao grupo controle (2,90 %) e ao que recebeu *B. subtilis* (2,93 %). Além disso, a eficiência alimentar foi aumentada ($P < 0,05$) pelo *B. licheniformis* e nenhum dos tratamentos afetou o CMS e o PV. A suplementação com *B. licheniformis* aumentou a digestibilidade aparente do rúmen da MO e FDN, a passagem de N-microbiano para o duodeno e o N-microbiano como proporção do N-ingerido ($P < 0,05$)

comparado aos grupos controle e *B. subtilis*. Não foram observados efeitos da suplementação com *Bacillus subtilis* sobre a degradabilidade ruminal e produção microbiana em vacas canuladas.

Por outro lado, em estudo com bezerros a administração de um probiótico contendo duas espécies de *Bacillus* não promoveu efeitos benéficos sobre o desempenho. Riddell et al. (2010) não observaram ganho em crescimento e parâmetros de saúde de bezerros jovens alimentados com *B. subtilis* e *B. lichenformis* (10^9 UFC/d) adicionado ao sucedâneo lácteo e suplementados com um concentrado inicial contendo 10^6 UFC/g de concentrado. Neste trabalho foi sugerido que os probióticos são mais eficazes durante os períodos de estresse. Assim, é possível que a falta de efeitos benéficos possa ser devido à falta de estresse imposto aos bezerros nesse estudo, pois os bezerros foram alojados em um ambiente de temperatura controlada e somente a mudança na dieta não causou estresse suficiente para a ação do probiótico.

2.5.2 Resposta imune à suplementação com *Bacillus*

Novak et al. (2012) realizaram um experimento para avaliar o efeito de um produto probiótico contendo uma mistura de cepas de *B. subtilis*, administrado a bezerros através de uma infusão oral de eletrólitos, sobre o sistema imune de bezerros leiteiros e concluíram que as espécies de *Bacillus* controlam patógenos e melhoram a função imunológica. Os bezerros foram alocados aos tratamentos com base na presença de diarreia, incluindo um grupo controle de bezerros sem diarreia que não foram tratados, com 3 a 10 dias de idade no dia 0. Os tratamentos foram: controle, eletrólito (Blue Ribbon, Merrick's, Inc., Union Center, WI), e eletrólito + *B. subtilis* (3×10^9 UFC/dose). Durante todo o estudo, foram 13 bezerros no controle, 26 bezerros no Eletrólito e 26 bezerros tratados com Eletrólito + *B. subtilis*. Oito bezerros foram amostrados por tratamento em cada dia de amostragem. Foram mensurados anticorpos monoclonais específicos para leucócitos bovinos usados para definir a expressão de moléculas de superfície celular e populações diferenciais de leucócitos por análise citométrica de fluxo e a concentração de alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), que é um marcador de fase aguda. As concentrações séricas de AGP foram maiores ($P \leq 0,05$) nos bezerros tratados com eletrólitos suplementados com *Bacillus*, em comparação aos bezerros do grupo controle e bezerros tratados apenas com eletrólitos no dia 7, enquanto não foram observadas diferenças na concentração de AGP entre os tratamentos nos dias 3, 14, 21, 28 e 42 do período de comparação. O estudo indicou que a suplementação com *Bacillus* alterou os fenótipos das células imunes do sangue periférico. A proporção de leucócitos citotóxicos ($CD4^+CD8^+$, $CD8^+CD45R^-$) foi maior ($P \leq 0,05$) em bezerros que receberam tratamento eletrolítico em comparação com os bezerros

não tratados. No dia 21, a proporção deste subconjunto citotóxico foi maior ($P = 0,01$) em bezerros tratados com eletrólito com *Bacillus* em comparação com bezerros tratados com eletrólito desprovido de *Bacillus*. O sangue periférico de bezerros tratados com eletrólitos desprovidos de *Bacillus* apresentou uma maior ($P \leq 0,05$) proporção de linfócitos citotóxicos de memória ($CD8^+CD45RO^+$) que os não tratados. Além disso, a proporção de linfócitos de memória exclusiva da população de células T citotóxicas ($CD8^+CD45RO^+$) foi maior ($P \leq 0,05$) em bezerros que receberam eletrólitos contendo *Bacillus* em comparação com bezerros sem escovação e bezerros receberam apenas eletrólitos. Os bezerros tratados com eletrólitos contendo *Bacillus* tiveram uma proporção maior ($P \leq 0,05$) de células que expressam o receptor de interleucina-2 (IL-2R; $CD8^+CD25^+$) no sangue periférico em comparação com bezerros dos outros tratamentos. Segundo os autores as populações de células $CD8^+$ bovinas podem aumentar devido a um desafio. Nesse estudo, a causa da diarreia não foi determinada, no entanto, concluiu-se que células $CD8^+$ estão associadas à diarreia, como evidenciado pelo aumento no grupo tratado. O aumento da incidência de células que expressam IL-2R ($CD8^+CD25^+$) em bezerros suplementados com eletrólitos contendo *Bacillus* também implica ativação e desenvolvimento de células imunológicas. Portanto o tratamento de diarreia dos bezerros com eletrólito suplementado com *Bacillus* pode fornecer benefícios adicionais além do efeito terapêutico, uma vez que também pode melhorar o desenvolvimento imunológico, conforme evidenciado pelo aumento dos elementos do sistema imune.

2.6 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão. São organismos normalmente aeróbios, mas podem sobreviver na ausência de oxigênio e podem ser encontradas no fluido ruminal, no entanto, é improvável que a levedura seja capaz de proliferar nesse ambiente. A temperatura no rúmen, em torno de 39°C , é mais alta que a temperatura ótima para crescimento de leveduras, que é de 25°C . As leveduras, portanto, são consideradas habitantes transitórios da microbiota do rúmen e, para que ocorram efeitos de células de leveduras vivas em ruminantes, o fornecimento deve ser em quantidade suficiente fornecida continuamente (LUND, 1974).

Os produtos comercializados mais comuns para ruminantes são as preparações de levedura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) (CHAUCHEYRAS-DURAND; DURAND, 2010). Os produtos de levedura seca são fabricados de maneira a manter um número específico de células vivas ($> 1,0 \times 10^{10}$ UFC/g de MS; CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008; ALZAHAL et al., 2014; MALEKKHAHI et al., 2016). A levedura é seca para preservar a

viabilidade celular e a atividade metabólica (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008). Outro aditivo à base de leveduras para alimentação de ruminantes é a cultura de levedura, que consiste em células mortas de leveduras e o meio de cultivo usado para seu crescimento, além de compostos oriundos de sua atividade metabólica, e não dependem da presença de células de levedura viva para ter ação fisiológica (POPPY et al., 2012).

Um dos mecanismos de ação propostos para leveduras vivas no rúmen é o consumo de oxigênio no ambiente ruminal pela própria atividade metabólica das células (NEWBOLD et al., 1996) e, com menor concentração de oxigênio no rúmen, as condições se tornam mais favoráveis para atividade da microbiota celulolítica (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008). Outro mecanismo de ação proposto para leveduras no rúmen é a estabilização do pH do fluido, prevenindo o acúmulo de lactato como consequência do estímulo a bactérias consumidoras de lactato (MARDEN et al., 2008; PINLOCHE et al., 2013) ou pela competição por açúcares com microrganismos produtores de ácido lático no fluido ruminal (CHAUCHEYRAS et al., 1996), resultando em um aumento da digestibilidade da fibra que pode ser consequência de pH ruminal mais estável ou do maior número de bactérias fibrolíticas no rúmen (WIEDMEIER; ARAMBEL; WALTERS, 1987; CHAUCHEYRAS-DURAND; FONTY, 2001). Os efeitos positivos na digestão de fibras podem ser parcialmente responsáveis pelo aumento do CMS, que pode ser observado com a suplementação de levedura (GUEDES et al., 2008; MARDEN et al., 2008).

2.6.1 Resposta animal à suplementação com leveduras

Pinloche et al. (2013) avaliaram a população de microrganismos ruminais em vacas suplementadas com probiótico composto por leveduras vivas. Três vacas canuladas no rúmen receberam um dos tratamentos: controle, 0,5 g/d ou 5 g/d de leveduras (*S. cerevisiae*, 10^{10} UFC/g de MS, BIOSAF SC 47, Lesaffre Feed Additives, France). O experimento foi conduzido em delineamento quadrado latino 3 x 3, com períodos de 21 dias. Os tratamentos foram oferecidos sobre a TMR, uma vez ao dia. As amostras do conteúdo ruminal foram coletadas em dois dias consecutivos, 4 h após a alimentação. Foram realizadas análises de biologia molecular para classificar as populações microbianas no rúmen. A suplementação com o probiótico aumentou o pH (5,81 para controle; 5,99 para 0,5 g/dia e 6,23 para 5 g/dia; $P < 0,05$). Animais que receberam a dose mais alta apresentaram maior produção de AGV ($P < 0,01$), com aumento da produção de propionato ($P < 0,01$) e butirato ($P < 0,05$). A suplementação com levedura induziu um aumento das populações de bactérias utilizadoras de lactato (*Megasphaera* e *Selenomonas*) e degradadoras de fibra (*Fibrobacter* e *Ruminococcus*). Portanto, leveduras são

capazes de estimular as bactérias que utilizam o lactato, estabilizando o pH ruminal e melhorando a degradação das fibras, com um ambiente favorável para bactérias fibrolíticas.

Em estudos com leveduras in vivo, é mais comum serem encontrados relatos de aumento no número de protozoários no fluido ruminal (PLATA et al., 1994; AL IBRAHIM et al., 2010). Entretanto, em estudo com cultura de levedura em um sistema simulador da fermentação ruminal, Newbold, McIntosh e Wallace (1998) constataram que ocorreu uma diminuição da contagem de protozoários ($3,77 \times 10^3/\text{mL}$ vs. $0,56 \times 10^3/\text{mL}$; $P < 0,001$) e a contagem direta em microscópio mostrou um aumento de 25 % das bactérias totais. A inibição do crescimento de protozoários é uma possível explicação para o aumento da população bacteriana e, este maior número de bactérias pode ser associado ao aumento de biomassa bacteriana sintetizada. O aumento das populações de bactérias no rúmen é frequentemente observado após a defaunação, isto pode ocorrer como uma resposta a redução da predação de bactérias por protozoários e, também, por ter mais substrato disponível para o crescimento bacteriano (WILLIAMS; COLEMAN, 1992).

Bitencourt et al. (2011) realizaram um experimento com vinte vacas holandesas ($143 \pm 48,8$ DEL), designadas para uma das duas seqüências de tratamento em um delineamento crossover com períodos de 28 dias. Os tratamentos foram: 1 g de levedura viva (*Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077; Lallemand SAS, Toulouse, França) em 9 g de farinha de ostra para uma ingestão diária mínima de 1×10^{10} UFC de levedura vaca. Havia $1,47 \times 10^9$ células viáveis por g do produto de levedura diluído (contagem de UFC). Os tratamentos foram oferecidos em top-dress a cada vaca na alimentação da manhã. A suplementação com levedura teve efeito positivo sobre a produção de leite (29,4 vs. 28,5 kg/d; $P = 0,11$), proteína (0,939 vs. 0,908 kg/d; $P = 0,05$) e lactose (1,264 vs. 1,241 kg/d; $P = 0,06$), porém não teve efeito sobre a gordura do leite ($P = 0,53$). Também foi observada uma tendência de aumento do CMS (21,4 vs. 20,7; $P = 0,11$) e da digestibilidade da FDN (48,1 % vs. 43,2 %; $P = 0,08$) com a suplementação de levedura, o que levou a uma tendência para maior consumo de matéria orgânica digestível (14,9 vs. 14,1; $P = 0,07$). Segundo os autores, o desempenho positivo dos animais suplementados foi provavelmente devido à melhor digestibilidade da fibra no trato digestivo total, embora a identificação dos mecanismos responsáveis pelo ganho na digestibilidade da fibra não tenha sido elucidada.

Gomide (2003) realizou um experimento com novilhas fistuladas no rúmen suplementadas com 0, 10 ou 30 g/d de levedura enzimaticamente autolisada. Foram avaliadas a digestibilidade da MS consumida e a degradabilidade ruminal do feno de tifton, bem como a concentração de AGV no fluido ruminal. O fornecimento de 30 g/d do aditivo tendeu a

aumentar velocidade de degradação da fração B da MS e da FDN incubada no rúmen. Foi observado aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia ímpar (C15:0 iso + C17:0 iso) no fluido ruminal, condizente com estímulo a população fibrolítica, e aumento da síntese de proteína microbiana no rúmen.

Moallem et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação de leveduras vivas em vacas leiteiras (114 ± 54 DEL) durante o verão. Os tratamentos foram: vacas alimentadas com dieta controle (CTL) ou suplementadas com 1 g de levedura viva (LY; *Saccharomyces cerevisiae*; Biosaf, Lesaffre Feed Additives, Lille, França) por 4 kg de MS consumida. A suplementação de LY aumentou o CMS em 0,6 kg/d (2,5 %), a produção de leite em 1,5 kg/d e a eficiência alimentar (+ 3,7) do que no grupo controle. Ainda foi observado um aumento no teor de lactose no grupo que recebeu LY comparado ao grupo controle (4,91 vs. 4,86 %) e a produção de lactose foi numericamente maior no grupo LY do que no grupo controle (1,810 vs. 1,887 g/d). No entanto, nenhum aumento na digestibilidade aparente da dieta foi demonstrado no grupo LY.

Em outro experimento, Salvati et al. (2015) avaliaram o efeito de leveduras para vacas leiteiras (207 ± 87 DEL) durante 10 semanas e foi obtido aumento da produção de leite (+ 1,3 kg/d; $P = 0,03$) e sólidos (+ 0,14 kg/d; $P = 0,05$) em vacas sob estresse térmico (ITU médio 71,8) recebendo 10 g/dia de leveduras, enquanto que para o CMS o aumento foi apenas numérico. A melhora no desempenho da lactação foi aparentemente impulsionada pelo aumento da secreção de lactose (1,187 vs. 1,135 kg/d; $P = 0,03$). O teor de niacina plasmática foi aumentado ($P = 0,05$) e foi observada uma tendência ($P = 0,09$) para o aumento do teor de glicose no plasma nas vacas suplementadas. Vacas que receberam levedura tiveram menor frequência respiratória do que vacas no grupo Controle e temperatura corporal similar, com isso, pode-se dizer que a suplementação de levedura facilitou a dissipação de calor, através da ação termorreguladora mediada pelo aumento da niacina. Foi avaliada a digestibilidade aparente no trato total da MS, MO, FDN e MO não-FDN e foi coletado líquido ruminal para mensuração do pH, concentração de AGV, lactato e contagem de protozoários. A levedura foi capaz de reduzir o lactato ($P = 0,02$) e o butirato ($P = 0,05$) como proporções dos ácidos orgânicos no rúmen, entretanto não foram obtidas diferenças de digestibilidade e a suplementação com levedura não foi capaz de aumentar o pH. Assim, o melhor desempenho de vacas sob estresse térmico suplementadas com leveduras deveu-se aparentemente a maior dissipação de calor e redução da exigência nutricional de manutenção, o que pode explicar o aumento da concentração plasmática de glicose e a maior síntese de lactose pela glândula mamária, já que o aditivo não induziu ganho na digestibilidade aparente de nutrientes.

Dias et al. (2018) realizaram um estudo para avaliar o efeito da cultura de levedura morta para vacas leiteiras (234 ± 131 DEL) durante o verão. Os tratamentos foram controle (CTL) ou cultura de levedura (YC), sendo 15 g/vaca/d. A suplementação com YC reduziu o CMS (-0,9 kg/d; $P = 0,04$), sem afetar a produção de leite, o que promoveu aumento da eficiência alimentar. A YC aumentou a concentração plasmática de niacina. O grupo de vacas do YC teve a temperatura retal, temperatura da pele e a frequência respiratória reduzidas, indicando que teve uma melhora do conforto térmico, além de ter reduzido a proporção de vacas com temperatura retal $\geq 39,2^\circ\text{C}$ ($P \leq 0,05$), definido como o limite para a ocorrência de estresse térmico (RHOADS et al., 2009). Houve uma tendência ($P = 0,10$) para vacas do grupo YC terem menor pO_2 no sangue jugular do que no CTL, provavelmente refletindo a redução na frequência respiratória. Contudo, o pH do sangue e o balanço ácido-base não foram afetados pelo tratamento ($P \geq 0,18$).

2.6.2 Resposta imune à suplementação com leveduras

As leveduras vivas são capazes de sobreviver à degradação ruminal e à digestão no abomaso e chegar ao intestino delgado (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 1998). A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* consiste de uma camada externa de manose associada a proteínas ou lipídeos e uma camada interna composta de quitina e glucanos (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007; MORAN, 2004). No intestino, mananoligossacarídeos da parede celular das leveduras têm a capacidade de se ligar e carrear microrganismos patogênicos, e glucanos e mananos estimulam a imunidade através da ativação do sistema imune inespecífico, estimulação de macrófagos, neutrófilos e células T, ativação de células NK e aumento da produção de anticorpos (MORAN, 2004). Mananos são os polímeros de manose e glucanos são polímeros de glicose. Os glucanos são capazes de estimular a imunidade em mamíferos por meio de respostas inflamatórias devido a receptores de glucanos presentes em macrófagos (DAWSON, 2002) e, essa ativação dos macrófagos, resulta em secreção de citocinas e aumento da fagocitose. Leveduras podem modular a expressão de genes ligados a interleucinas pró-inflamatórias, importantes no recrutamento e ativação de células do sistema imune em tecido epitelial intestinal de suínos (ZANELLO et al., 2011).

Além dos efeitos sobre o intestino, é provável que a suplementação de levedura viva, atuando diretamente sobre as células epiteliais ou indiretamente, através da modificação do ambiente ruminal (modulando o pH), possa exercer alguns efeitos sobre o epitélio ruminal. Bach et al. (2018) hipotetizaram que os epitélios do rúmen e do cólon sofrem mudanças em sua estrutura de barreira, transporte de nutrientes, divisão celular e integridade, e funções

imunológicas como consequência das diferenças no tipo de dieta quando as vacas saem do período seco para a lactação, e que essas alterações podem ser influenciadas pela suplementação de levedura viva, devido aos seus efeitos no pH ruminal e na composição microbiana ruminal. Vinte e uma vacas holandesas foram divididas em dois grupos de tratamento e receberam 300 g/d de milho contendo 3,3 g/kg (equivalente a 1×10^{10} UFC/d) de levedura viva (LY; *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077; Lallemand SAS, Blagnac, França) ou 300 g/d de milho sem suplementação (controle) a partir de 21 dias antes do parto até 21 dias de lactação. O CMS nos primeiros 21 DEL foi maior ($P < 0,05$) nas vacas LY ($18,2 \pm 0,77$ kg/d) do que nas vacas controle ($15,7 \pm 0,77$ kg/d), da mesma forma que a produção de leite foi maior ($P < 0,05$) nas vacas LY ($38,7 \pm 2,85$ kg/d) do que nas vacas controle ($32,7 \pm 2,85$ kg/d). As vacas LY tiveram maior expressão ($P < 0,05$) de TLR4 no epitélio ruminal antes do parto do que as vacas do controle, que tiveram a menor expressão de TLR4 aos 21 DEL. Esses receptores são capazes de reconhecer microrganismos patogênicos e não patogênicos e modular respostas imunes do hospedeiro através de vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A expressão de TNFalfa, uma citocina pró-inflamatória, no epitélio ruminal das vacas controle foi menor ($P < 0,05$) aos 21 DEL, mas nas vacas LY manteve-se estável. Entretanto, a expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, no epitélio ruminal em vacas controle foi maior ($P < 0,05$) aos 7 DEL, enquanto a expressão em vacas LY foi maior antes do parto. Portanto, o aumento do estado de inflamação nas vacas LY ocorreu durante o período pré-parto, enquanto nas vacas controle o aumento ocorreu no pós-parto. Flutuações na expressão dos genes selecionados no cólon entre os dois estágios de produção e dois tratamentos foram muito menores do que os observados no rúmen, provavelmente porque a quantidade de levedura viva que chega ao cólon é menor do que a quantidade que chega ao rúmen (Durand-Chaucheyras et al., 1998). Não houve diferenças na expressão de TLR4 na mucosa do cólon entre os tratamentos ou estágios de produção, mas a expressão de TLR4 na mucosa do cólon foi maior ($P < 0,05$) do que a observada no rúmen, o que sugere que o cólon pode ter um papel mais importante no sistema imunológico gastrointestinal comparado ao rúmen. Os resultados da expressão gênica apresentados refletem a adaptação ruminal ao aumento de concentrado após o parto, incluindo o remodelamento do epitélio e a redução da expressão de TLR4, juntamente com um aumento na expressão da IL-10 anti-inflamatória. A suplementação de levedura viva antes e após o parto aumentou a expressão de TLR4, IL-10 antes do parto, mas manteve a expressão de TNFalfa estável em comparação com as vacas não suplementadas. Essas alterações podem ser devidas a um efeito direto da levedura viva ou a um efeito indireto decorrente do aumento do CMS no início da lactação, causado pela suplementação de levedura viva.

Sabendo-se que uma resposta imune específica contribui para o desenvolvimento de animais saudáveis e produtivos, Spaniol et al. (2014) realizaram um experimento com 30 vacas da raça Holandês, com média de $32 \pm 3,8$ kg/d e 129 ± 26 DEL, com um probiótico contendo *S. cerevisiae* na concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/g. O grupo que recebeu o probiótico apresentou menor CCS comparado ao grupo controle e teve um aumento dos níveis de citocinas circulantes (TNF- α , IL-4 e INF- γ). Essa concentração aumentada de citocinas pode ser associada a um estímulo da resposta imune. Desse modo, apesar de não ter afetado a produção e composição do leite, a adição de *S. cerevisiae* na dieta como um probiótico para vacas leiteiras foi capaz de reduzir a CCS após 30 dias de uso, sugerindo um efeito benéfico no sistema imunológico de vacas em lactação.

Em outro experimento, Buntyn et al. (2014) avaliaram o efeito da suplementação de novilhos confinados com *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1079 (SC) na resposta de fase aguda a um desafio com lipopolissacarídeo (LPS). Foram utilizados 18 novilhos (266 ± 4 kg de PV) divididos em 3 tratamentos: dieta padrão (Controle); dieta padrão suplementada com SC (Lallemand, Inc.), sendo 0,5 g/novilho/d (SC-0,5); e dieta padrão suplementada com 5,0 g/novilho/d de SC (SC-5,0) por 29 d. Os novilhos foram desafiados por via intravenosa com LPS (0,5 microgramas/kg de PV) no dia 28 e foram coletadas amostras de sangue com intervalos de 30 min de -2 a 8 horas e 24 horas após o desafio. Antes do desafio, houve um efeito do tratamento ($P < 0,01$) na temperatura retal, os novilhos SC-0,5 ($39,50 \pm 0,03^\circ\text{C}$) apresentaram temperatura retal mais alta que os novilhos do grupo Controle ($39,06 \pm 0,04^\circ\text{C}$) e do grupo SC-5,0 ($39,27 \pm 0,04^\circ\text{C}$). Após o desafio com LPS, o grupo controle apresentou a maior variação na temperatura retal ($0,434 \pm 0,0510^\circ\text{C}$), em comparação com SC-0,5 ($-0,059 \pm 0,039^\circ\text{C}$) e SC-5,0 ($-0,007 \pm 0,045^\circ\text{C}$). Houve um efeito de tratamento ($P < 0,05$) para todas as citocinas analisadas (TNF- α , IL-6 e INF- γ). As citocinas foram mais baixas nos grupos SC-0,5 e SC-5,0 em comparação com o grupo Controle após desafio com LPS, demonstrando que a suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* nas doses utilizadas foi capaz de reduzir a resposta inflamatória.

2.7 Comportamento alimentar e seleção de partículas

Leonardi e Armentano (2003), em um estudo realizado com vacas leiteiras, observaram que os animais selecionam a dieta para consumo. O consumo de partículas em relação à quantidade oferecida aumentou progressivamente à medida que o tamanho das partículas diminuiu. Em geral, quando são alimentadas com uma dieta contendo 40% de forragem e 60% de concentrado, as vacas selecionam contra partículas mais longas e a favor de partículas curtas.

A quantidade de sobras foi negativamente relacionada à seleção de partículas longas (LEONARDI; ARMENTANO, 2007). É importante saber que os animais se comportam de maneira diferente e selecionam em graus diferentes, e que além da variação que ocorre entre os animais, o comportamento de seleção de alimento também pode variar para um mesmo animal ao longo do tempo. Um animal mais seletivo tem uma dieta progressivamente mais grosseira à medida que o dia avança (LEONARDI; ARMENTANO, 2003). Portanto a seleção de alimento pode ser motivada por fatores internos. A seleção de partículas por vacas leiteiras pode ser alterada de acordo com o ambiente ruminal. A seleção de partículas longas irá ocorrer em resposta a um baixo valor de pH ruminal (DEVRIES; DOHME; BEAUCHEMIN, 2008).

Bach et al. (2007) sugeriram que, entre os mecanismos envolvidos na redução da acidose subclínica associada à suplementação de levedura viva, a frequência da refeição pode ser um fator importante a ser considerado. Um ambiente ruminal mais favorável também poderia resultar em maior atividade de ruminação (DEVRIES et al., 2009), o que contribuiria ainda mais para a estabilização do pH ruminal.

Considerando que o comportamento alimentar pode afetar o pH ruminal (ALLEN, 1997), o uso de leveduras vivas, por ser capaz de alterar a fermentação ruminal e estabilizar o pH, torna provável que tenha efeito sobre comportamento ingestivo. Um perfil de fermentação ruminal mais consistente pode resultar em menor variação na produção de AGV, melhor digestibilidade da fibra e em um retorno mais rápido à alimentação. Ferraretto et al. (2012) não encontraram diferenças no comportamento alimentar quando as vacas foram suplementadas com levedura viva, sugerindo que isso ocorreu devido à falta de efeito sobre a produção de propionato ruminal.

DeVries e Chevaux (2014) realizaram um experimento com doze vacas em início de lactação ($48,6 \pm 16,5$ DEL), alocadas aleatoriamente a um dos dois tratamentos (Controle ou 1×10^{10} UFC/d de leveduras vivas; *S. cerevisiae* CNCM I-1077; Levucell SC20; Lallemand). O comportamento alimentar, ruminação e o consumo de alimento foram monitorados por sistemas eletrônicos. O CMS foi similar entre os tratamentos. A suplementação com levedura viva resultou em melhorias no comportamento alimentar, com refeições mais frequentes que tendem a ser menores e com menores intervalos e as vacas que receberam levedura também tenderam a ruminar mais. Apesar de selecionarem mais contra as partículas longas da dieta, as vacas suplementadas com levedura tenderam a ter maior teor e produção de gordura no leite.

2.8 Termorregulação

Vacas leiteiras submetidas a ambientes de alta temperatura e umidade podem ter as eficiências de produção e reprodução prejudicadas. O incremento calórico da fermentação ruminal e do metabolismo pós-absorção de energia contribui para o aumento da temperatura corporal caso o calor corporal não seja dissipado para o ambiente. Em clima quente, onde o gradiente entre as temperaturas do animal e do ambiente é reduzido, a menor dissipação do calor oriundo da fermentação ruminal e metabolização dos nutrientes pode ser um risco para o equilíbrio térmico (homeotermia) do animal.

Animais homeotérmicos devem manter um equilíbrio entre a produção de calor de metabolismo, o calor absorvido do ambiente e a perda de calor para o ambiente. A evaporação da umidade pela superfície da pele e o aumento da frequência respiratória são os mecanismos primários usados pelos animais para perder o calor excessivo do corpo (KADZERE et al., 2002). Segundo o NRC (1981), quando a umidade do ar está mais alta, menor o gradiente de umidade entre a pele e o ar, e menor a taxa de perda de calor por evaporação. A alta umidade do ar afeta principalmente os animais muito dependentes da sudorese para que ocorra perda de calor.

Thom (1958) sugeriu o uso do Índice de Temperatura-Umidade (ITU) para descrever as condições climáticas com base na combinação dos dois fatores. Kadzere et al. (2002) revisaram a literatura e sugeriram que ambientes com valores de ITU até 70 seriam confortáveis, entre 75 e 78 seriam estressantes e acima de 78 seriam considerados extremamente estressantes para vacas leiteiras, tornando-as incapazes de sustentar os mecanismos termorregulatórios para evitar um aumento da temperatura corporal. Contudo, o limite do ITU pode variar com o nível de produção de leite do animal. Os animais de alta produção leiteira tendem a ser mais suscetíveis ao estresse térmico devido à maior produção de calor de metabolismo, como consequência da digestão e da produção, o que os torna mais sensíveis ao calor e, portanto, o limite do ITU é reduzido. Zimbelman et al. (2009) realizaram oito estudos utilizando cem vacas Holandesas multíparas, com média de produção de 35 kg/d, em câmaras climáticas durante três anos. Estes autores concluíram que o ITU mínimo diário com valores iguais ou maiores a 65 ou média diária de ITU de 68 por mais de 17 h/d podem reduzir 2,2 kg/d na produção de leite. Visto que estes valores de ITU podem induzir o estresse por calor, foi sugerido que ITU de 68 deve ser considerado o limite máximo para vacas de maior produção.

O alto calor metabólico requer mecanismos termorregulatórios eficazes para manter a temperatura corporal na homeostase fisiológica (KADZERE et al., 2002). A mensuração da temperatura retal é comumente utilizada por ser um parâmetro sensível e um bom indicador da

temperatura corporal e de estresse térmico (FUQUAY et al., 1979). Zimbelman et al. (2009) correlacionaram o ITU com a temperatura retal ($r = 0,52$) e com a produção de leite ($r = -0,12$). O aumento na temperatura foi correlacionado com o aumento na frequência respiratória ($r = 0,75$) e na perda de calor evaporativo da pele ($r = 0,24$), portanto, essas são medidas que podem ser obtidas para avaliar o grau de estresse térmico no animal. Cook et al. (2007) observaram uma redução do tempo deitada de vacas leiteiras quando o ITU foi acima de 68. Em outro experimento conduzido em clima quente, Allen et al. (2015) relataram mudança no comportamento de vacas leiteiras, com o aumento do ITU e da temperatura corporal, vacas passaram mais tempo em pé. Este tipo de mudança de comportamento ocorre para melhorar a perda de calor por aumento da área de superfície do corpo exposta ao ar, entretanto, pode prejudicar a saúde dos cascos dos animais e conseqüentemente a produção e a longevidade.

2.9 Balanço ácido-básico do sangue

A manutenção do pH em valores fisiológicos é de extrema importância para manter a homeostase do organismo e variações podem afetar inúmeros processos metabólicos. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch, a manutenção do pH sanguíneo depende principalmente das concentrações de ácido carbônico e bicarbonato no sangue (COPPOCK et al., 1982). Valores de pH sanguíneo abaixo de 7,4 geram um aumento da frequência respiratória, enquanto que valores acima diminuem, da mesma forma que uma pressão parcial de CO_2 (pCO_2) maior que 40 mmHg gera um estímulo na respiração, enquanto que abaixo desse valor ocorre inibição (KADZERE et al., 2002).

Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, quatro tipos de distúrbios podem ocorrer: acidose metabólica, quando ocorre queda de HCO_3^- ; alcalose metabólica, quando o HCO_3^- é aumentado; acidose respiratória, quando há um aumento da pCO_2 ; e a alcalose respiratória, que é quando há uma queda da pCO_2 (CONSTABLE, 2000). A concentração de HCO_3^- é regulada pelos rins, enquanto que a pCO_2 é regulada pelos pulmões (FIGUEIREDO, 1995). A mudança na ventilação pulmonar depende da concentração de H^+ , pCO_2 e pressão parcial de O_2 (pO_2), que vão agir sobre o centro respiratório no sistema nervoso central (FIGUEIREDO, 1995).

O balanço ácido-básico sanguíneo pode ser utilizado para avaliação de estresse por calor em animais. Vacas em condições de estresse térmico têm a frequência respiratória elevada para maior dissipação do calor, o que implica em metabolismo debilitado (KADZERE et al., 2002). A pO_2 é o parâmetro utilizado para avaliar a oxigenação, e a pCO_2 é utilizada indicativo de ventilação pulmonar (GOMES et al., 1997). Quando o animal está em situação de estresse por

calor a frequência respiratória sofre um aumento, a hiperventilação eleva a pO_2 (HALES; FINDLAY, 1968) e reduz a pCO_2 e, buscando manter o balanço, os rins aumentam a secreção de HCO_3^- . Os rins aumentam a secreção de HCO_3^- para manter constante a relação na proporção de 20:1 de $pCO_2:HCO_3^-$ e para tamponar o pH sanguíneo. Como consequência ocorre uma redução do HCO_3^- no sangue e um aumento do pH urinário. A correção da alcalose urinária é feita pela excreção renal de H^+ , que resulta na reabsorção de HCO_3^- no sangue (SCHNEIDER; BEEDE; WILCOX, 1988). Schneider et al. (1986) observaram que vacas leiteiras em ambiente sem sombreamento apresentaram um aumento significativo da temperatura retal (39,8 vs. 40,6°C), da frequência respiratória (97 vs. 125 respirações/min) e no pH sanguíneo (7,39 vs. 7,44), e redução da pCO_2 (36,3 vs. 30,5 mmHg) e do HCO_3^- (21,8 vs. 20,2 mmol/L), quando comparadas com vacas em ambiente sombreado.

2.10 Imunidade

A resposta imune é iniciada com o reconhecimento do patógeno ou corpo estranho e, como consequência, é formada uma reação para eliminá-lo. O local da infecção e o tipo de patógeno determinam em grande parte que tipo de resposta imune será efetivo. O sistema imune do hospedeiro é capaz de formar resposta imune inespecífica (inata), que não depende de exposição prévia, e específica (adaptativa) que fornece proteção após a exposição ao antígeno específico e é caracterizada pela memória imunológica. A primeira exposição a um patógeno afeta a resposta imune inata e, então, mediadores como citocinas podem ser liberados. A resposta imune inata é a imunidade presente em todos os animais no nascimento, que consiste em mecanismos de defesa química e celular de resposta rápida (por exemplo, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, citocinas e células natural killer) e que não precisam ser induzidas por exposição prévia a um agente infeccioso (SORDILLO; STREICHER, 2002; BUNTYN et al., 2016).

Citocinas são proteínas produzidas naturalmente que desempenham um papel essencial na defesa do hospedeiro, regulando a atividade das células que participam da imunidade específica e inespecífica (SORDILLO et al., 1997). A imunidade específica envolve linfócitos com receptores para um antígeno específico (ERICKSON; HUBBARD, 2000). Segundo Krehbiel et al. (2003), no trato gastrointestinal, uma única camada de células epiteliais separa o lúmen da lâmina própria, proporcionando ao seu hospedeiro uma barreira seletiva contra a presença constante de antígenos vindos de alimentos e microrganismos no lúmen do intestino, sendo essa barreira a primeira linha de defesa. Além das células epiteliais, também existem células do sistema imune no trato gastrointestinal.

O impacto do consumo de probióticos sobre o sistema imune do hospedeiro é um benefício conhecido, mas as pesquisas ainda são limitadas. A administração oral de *Lactobacillus* geralmente resulta em um aumento das respostas imunes inatas (aumenta fagocitose e atividade das células natural killer). No entanto, a influência dos probióticos na produção de citocinas e nas respostas de células T e B mostram resultados variados, dependendo da cepa, dose e duração da suplementação com probiótico, e também dos tipos de tecidos e células (KREHBIEL et al., 2003). Foi demonstrado por Christensen, Frokiaer e Pestka (2002) que espécies e cepas de *Lactobacillus* influenciam diferencialmente a produção de citocinas por células dendríticas in vitro, o que sugere que a atividade in vivo de células T reguladoras pode ser influenciada por células dendríticas que foram expostas a microorganismos específicos da microbiota intestinal ou probióticos ingeridos e uma espécie pode ser capaz de inibir a atividade de outra espécie do mesmo gênero.

A produção de citocinas é regulada por vias de transdução de sinal intracelular que são ativadas após o reconhecimento de microrganismos ou componentes microbianos através de receptores, como os TLRs (receptores tipo toll), que existem na superfície das células do sistema imune e permitem diferenciar a microbiota intestinal de patógenos (KAJI et al., 2010; O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010).

Os probióticos quando ingeridos devem encontrar macrófagos e células dendríticas para estimular a secreção de citocinas que, por sua vez, direcionam as respostas imunológicas do hospedeiro, definindo o perfil das respostas (KAJI et al., 2018). Segundo Trinchieri (2003) e Kaji et al. (2010), as citocinas IL-12 e IL-10 são importantes devido à necessidade de haver um balanço da produção das mesmas e aos potenciais benefícios da indução, como defesa contra doenças intestinais inflamatórias, doenças auto-imunes, alergias e infecções. Isto ocorre porque a IL-12 é essencial para aumentar a defesa imunológica contra infecções e cânceres, enquanto a IL-10 promove o desenvolvimento de células T reguladoras para o controle de respostas imunológicas excessivas, para evitar doenças inflamatórias. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e espera-se que auxilie nas inflamações crônicas, como doenças inflamatórias intestinais e doenças autoimunes, enquanto que a IL-12 é um importante mediador da imunidade e espera-se que aumente a defesa natural contra infecções (KAJI et al., 2010). A IL-10 regula negativamente as funções fagocíticas e das células T, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-2, TNF-alfa e IFN-gamma. A produção de IL-10 e IL-12 é regulada reciprocamente (MA et al., 2015) e varia com cada cepa de probióticos, o que pode ser responsável por seus efeitos específicos no sistema imune do hospedeiro (KAJI et al., 2010).

Kaji et al. (2018) avaliaram o efeito de diferentes ligantes de TLR na produção de IL-10 e IL-12 usando macrófagos estimulados com *Lactobacillus casei Shirota* (LcS), que predominantemente induz a produção de IL-12, e observaram que probióticos podem regular com de modos diferentes as respostas das citocinas de acordo com o ambiente microbiano. Ligantes microbianos para TLR3 e TLR5 aumentaram a produção de IL-12 por LcS, por outro lado ligantes para TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 converteram o padrão de produção de citocinas de IL-12 para IL-10. Estes resultados indicam que a indução probiótica da produção de IL-10 e IL-12 pode ser modificada de forma flexível por estimulação com componentes microbianos. Isto pode explicar a diferença na eficácia de um determinado probiótico na imunomodulação entre diferentes indivíduos.

Segundo Winkler et al. (2007), a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que caracteriza o tipo de resposta imune Th1, pode induzir a produção de proteínas de fase aguda ou quimiocinas, provocar reações febris e desencadear o recrutamento de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e monócitos, para os tecidos, o que é necessário para interromper a infecção. Os monócitos presentes no sangue são recrutados quando se inicia um processo inflamatório e, ao chegarem ao tecido, se diferenciam em macrófagos (Alnaki et al., 2014). Por outro lado, citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5, e IL-13, aumentam a imunidade humoral e ativam os eosinófilos e os mastócitos e estão relacionadas com a produção de anticorpos IgE. As citocinas de cada grupo influenciam-se reciprocamente e de forma contrária. O IFN-gamma produzido pelas células Th1 inibe a diferenciação das células Th2, e a IL-10, quando secretada pelas células Th2, reduz a secreção de citocinas Th1 (WINKLER et al., 2007). Resposta do tipo Th1 são mais eficientes contra fungos, bactérias e vírus, enquanto que a resposta Th2 é efetiva à helmintos, ectoparasitos e alérgenos (ROMAGNANI, 1992).

Segundo Valdez, Brown e Finlay (2014) probióticos podem ser utilizados no período de vacinação devido a potencial capacidade que eles têm de conseguir melhorar a eficácia da vacina estimulando adequadamente o sistema imunológico (efeito adjuvante). Entretanto, apesar de existirem evidências de efeitos imunomoduladores, os mecanismos por trás dos efeitos benéficos propostos dos probióticos na vacinação permanecem desconhecidos (VITETTA et al., 2017; VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). Podem ocorrer variações de resultados por esses estudos serem altamente dependentes de condições experimentais, incluindo cepa e dose do probióticos administrado, tipo de vacina e a população estudada.

2.10.1 Imunidade da glândula mamária

O sistema de defesa da glândula mamária desempenha um papel importante na proteção contra patógenos. O canal do teto funciona como a primeira barreira contra infecções, com características anatômicas e fisiológicas (tensão de fechamento e revestimento de queratina) que inibem a penetração de patógenos no úbere (TARGOWSKI, 1983; SORDILLO et al., 1997). No entanto, algumas bactérias podem ser capazes de passar pelos mecanismos de defesa primária e invadir a glândula mamária (TARGOWSKI, 1983). Uma vez que os microrganismos penetram no canal do teto, encontram sistemas imunológicos associados à glândula mamária que são fundamentais na proteção contra doenças infecciosas.

A imunidade inata, também conhecida como resposta inespecífica, é o tipo de defesa que atua durante os estágios iniciais de uma infecção. As respostas inespecíficas da glândula mamária são mediadas pela barreira física da extremidade do teto, macrófagos, neutrófilos, células do tipo natural killer (NK) e por fatores solúveis (SORDILLO; STREICHER, 2002). Enquanto que a resposta imune específica, ou adquirida, reconhece determinantes específicos de um patógeno que facilitam a eliminação seletiva, sendo este reconhecimento mediado por moléculas de anticorpos, macrófagos e populações linfóides. Alguns linfócitos possuem “memória”, o que permite que respostas imunes específicas possam ser aumentadas pela exposição repetida a um patógeno, diferente da resposta inespecífica (SORDILLO et al., 1997).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos são as células fagocíticas funcionais do corpo. Os macrófagos juntamente com células epiteliais iniciam a resposta inflamatória necessária para eliminar as bactérias invasoras. O início da reação inflamatória é causado pela produção e liberação do fator de necrose tumoral, interferons e interleucinas (PAAPE et al., 2002). As atividades de leucócitos residentes e recém-recrutados na glândula mamária desempenham um papel fundamental no estabelecimento da infecção intramamária (SORDILLO et al., 1997).

A contagem de células somáticas (CCS) do leite é considerada um indicador sensível de inflamação e, portanto, deve ser usada para monitorar a saúde do úbere (HARMON, 1994; PYORALA, 2003; SCHUKKEN et al., 2003). A CCS consiste em vários tipos de células, incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos e uma menor porcentagem de células epiteliais (BURVENICH et al., 1994; SORDILLO et al., 1997). Variações na CCS dependem, principalmente, do recrutamento de leucócitos do sangue para o tecido e para o leite, em resposta a uma reação inflamatória provocada no tecido mamário pelas bactérias invasoras (BURVENICH et al., 1994). Na glândula mamária saudável (abaixo de 10^5 células somáticas/mL), a maioria das células somáticas viáveis são macrófagos e linfócitos, com alguns

neutrófilos e células epiteliais. Entretanto, se a saúde da glândula mamária é afetada e as bactérias invasoras conseguem se multiplicar, diversos fatores solúveis são liberados pelas células da glândula mamária, que provocam um aumento no recrutamento de leucócitos adicionais, principalmente neutrófilos, o que altera o número e tipos predominantes de células somáticas (geralmente superam 10^6 células/mL e mais que 95 % são neutrófilos) (SORDILLO; STREICHER, 2002; KEHRLI; SHUSTER, 1994). No local da infecção, os neutrófilos são responsáveis por fagocitar e eliminar os patógenos bacterianos (SORDILLO et al., 1997).

Existe o consenso de que se deve selecionar contra animais de CCS alta, mas as opiniões divergem quanto à CCS baixa. Tem sido sugerido que a CCS em níveis muito baixos pode influenciar a infecção por patógenos na glândula mamária, aumentando a suscetibilidade à mastite clínica (SCHUKKEN et al., 1989; RAINARD et al., 2018), o que pode significar que existe uma CCS ideal que é baixa, mas não necessariamente a menor possível. Entretanto, existem autores que acreditam que se deve manter uma concentração razoável de células no leite (KEHRLI; SHUSTER, 1994), enquanto outros autores não observaram um limite inferior para CCS que esteja relacionado à incidência de mastite (RUPP; BEAUDEAU; BOICHARD, 2000). Segundo Kherli e Shuster (1994) o pequeno número de células somáticas normalmente presentes na glândula mamária tenta resolver uma infecção imediatamente e, se for capaz, então não ocorrerá nenhum aumento perceptível na CCS e não será constatada nenhuma doença clínica e o recrutamento de leucócitos é interrompido e a CCS retorna a níveis normais. Ainda que ocorra um aumento da CCS no leite, esta é uma resposta necessária e está correlacionada aos microrganismos na glândula mamária e essa resposta é o que torna a vaca capaz de sobreviver a um desafio microbiano e retornar para produção normal.

Barkema et al. (1998) realizaram um experimento para avaliar a relação entre a CCS e a taxa de incidência de mastite clínica (TIMC). A CCS foi dividida em três categorias: ≤ 150.000 (baixa), 151.000 a 250.000 (média) ou 251.000 a 400.000 /ml (alta). Foram estudados 300 rebanhos, 100 por categoria de CCS por 1,5 ano. Para a TIMC foram considerados que intervalos entre casos de mastite clínica no mesmo quarto deveriam ser ≥ 14 d para um caso a ser incluído na análise. Os dias em risco foram calculados como o número total de dias durante o estudo em que uma vaca estava presente no rebanho, começando 7 dias antes do primeiro parto, menos 14 dias depois de cada caso de mastite clínica. Cálculos de mastite clínica incluíram o número total de casos e o número de casos por espécie de bactéria patogênica. Também foram registrados as datas e os motivos de abate de cada vaca. Rebanhos com baixa CCS não tiveram TIMC significativamente maior do que rebanhos com média ou alta CCS. A maior variação ocorreu em rebanhos que tinham baixa CCS, apresentando as

maiores e menores TIMC. A ocorrência de mastite clínica causada por *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, ou *Pseudomonas spp.*, foi maior em rebanhos de baixa CCS, enquanto que a mastite causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* foi mais frequente nos rebanhos de alta CCS. O descarte por mastite clínica não foi afetado pelas categorias de CCS, contudo, a taxa de descarte por alta CCS foi menor em rebanhos de baixa CCS.

REFERÊNCIAS

- ABOU-AKKADA, A. R.; B. H. HOWARD. 1960. The biochemistry of rumen protozoa. 3. The carbohydrate metabolism of Entodinium. **Biochemical Journal**, v. 76, p. 445–451.
- AL IBRAHIM, R. M. et al. The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, and rumen fermentation of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5318–5328, 2010.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447–1462, 1997.
- ALLEN, J. D.; HALL, L. W.; COLLIER, R. J. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 118–127, 2015.
- ALNAKIP, M. E. et al. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, v.2014, p.1–31, 2014.
- ALZAHAL, O. et al. Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 7751–7763, 2014.
- 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. 146–153, 2007.
- 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.
- BARKEMA, H.W. et al. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 411–419, 1998.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1628–1640, 2003.
- BEAUCHEMIN, K. A.; KREHBIEL, C. R.; NEWBOLD, C. J. Enzymes, bacterial direct-fed microbials and yeast: principles for use in ruminant nutrition. **Biology of Nutrition in Growing Animals**, v. 4, p. 251–284, 2006.
- BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, p. 160–174, 2012.
- BITENCOURT, L. L. et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 301–307, 2011.
- BROWN, M. Modes of action of probiotics: Recent developments. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 1895–1900, 2011.

- BUNEŠOVÁ, V. et al. Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves. **Livestock Science**, v. 178, p. 317–321, 2015.
- BUNTYN, J. O. et al. Modulation of the acute phase response in feedlot steers supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 43–44, 2014.
- BUNTYN, J. O. et al. The role of direct-fed microbials in conventional livestock production. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 335–355, 2016.
- BURVENICH, C. et al. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced e.coli mastitis in cows immediately after calving. **Veterinary Quarterly**, v. 16, p. 45–50, 1994.
- CALLAWAY, T. R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 9, p. 217–225, 2008.
- CHAUCHEYRAS, F. et al. 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, n. 9, p. 927–933, 1996.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial Microbes**, v. 1, p. 3–9, 2010.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. **Reproduction Nutrition Development**, v 41, p. 57–68, 2001.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past , present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 5–26, 2008.
- CHIQUETTE, J. et al. *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: Effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3536–3543, 2008.
- CHOUDHARI, A.; SHINDE, S.; RAMTEKE, B. N. Prebiotics and probiotics as health promoter. **Veterinary World**, v. 1, p. 59–61, 2008.
- COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 147–156, 2004.
- COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1052S–1057S, 1999.
- CONSTABLE, P. D. Clinical assessment of acid-base status: comparison of the Henderson-Hasselbach and Strong Ion Approaches. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 29, p. 115–128, 2000.

- COOK, N.B. et al. The effects of heat stress and lameness on time budgets of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1674–1682, 2007.
- COPPOCK, C. E. et al. Lactating dairy cow responses to dietary sodium, chloride, and bicarbonate during hot weather. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 566-576, 1982.
- CORTHESEY, B et al. Cross-talk between probiotic host immune system. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 781S–790S, 2007.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins : Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology** v. 3, p. 777–788, 2005.
- CHRISTENSEN, H. R.; FROKIAER, H.; PESTKA, J. J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 171–178, 2002.
- CUTTING, S.M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, p. 214–220, 2011.
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 767–778, 2007.
- DAUDELIN, J. et al. Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. **Veterinary Research**, v. 42, p. 1–11, 2011.
- DESNOYERS, M. 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.
- DEVRIES, T. J.; CHEVAUX, E. Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 6499–6510, 2014.
- DEVRIES, T. J.; DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3958–3967, 2008.
- DEVRIES, T. J. et al. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5067–5078, 2009.
- 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.
- DICKS, L. M. T.; BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v. 1, p. 11–29, 2010.
- ELAM, N.A. et al. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2686-2698, 2003.
- ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of

low quality roughages in ruminants. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, p. 526–533, 2015.

ERICKSON, K. L.; HUBBARD N. E. Probiotic immunomodulation in health and disease. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 403–409, 2000.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.

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, p. 4017–4028, 2012.

FIGUEIREDO, E. A. Equilíbrio ácido-básico. In: Vieira, E. C. et al. **Química fisiológica**. São Paulo: Atheneu, p. 87–105, 1995.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I. et al. Probiotics and prebiotics - perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1341–1348, 2011.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 4745–4767, 2014.

FISHER, K.; PHILLIP, P. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Food Microbiology**, v. 155, p. 1749–1757, 2009.

FRANCISCO, C. C. et al. Propionibacteria fed to dairy cows: effects on energy balance, plasma metabolites and hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1738–1751, 2002.

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

FUQUAY, J. W. et al. Modifications in freestall housing for dairy cows during the summer. **Journal of Dairy Science**, v. 62, p. 577–583, 1979.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S15–S28, 2010.

GHORBANI, G. R. et al. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1977–1986, 2002.

GILL, H. S. et al. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 167–176, 2000.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 755–773, 2003.

- GOMEZ-BASAURI, J.; ONDARZA, M. B.; SICILIANO-JONES, J. Intake and milk production of dairy cows fed lactic acid bacteria and mannanoligosaccharide. **Journal of Dairy Science**, v. 84, Suppl. 1, p. 283, 2001.
- GOMIDE, D. R. Resposta digestiva de bovinos a doses de levedura autolisada. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- GOUDARZI M.; GOUDARZI H.; RASHIDAN M. Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. **Novelty in Biomedicine**, v. 2, p. 22–30, 2014.
- GUEDES, C. M. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 27–40, 2008.
- HALES, J. R. S.; FINDLAY, J. D. The oxygen cost of thermally-induced and CO₂-induced hyperventilation in the ox. **Respiration Physiology**, v. 4, p. 353–362, 1968.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103–2112, 1994.
- HEMAISWARYA S. et al. Mechanism of action of probiotics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 113–119, 2013.
- HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut ora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85–101, 1998.
- HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343–362, 1995.
- HONG, H. A.; LE, H. D.; CUTTING, Simon M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813–835, 2005.
- KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, p. 59–91, 2002.
- KAJI, R. et al. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *Lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 3505–3513, 2010.
- KAJI, R. et al. Short communication: Probiotic induction of interleukin-10 and interleukin-12 production by macrophages is modulated by co-stimulation with microbial components. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1–4, 2018.
- KEHRLI, M.; SHUSTER, D. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 619–627, 1994.
- KHAN, R. U.; NAZ, S. The applications of probiotics in poultry production. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 621–632, 2013.
- KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103–125, 1998.

- KLOPFENSTEIN, T.J.; PURSER, D.B.; TYZNIK, W.J. Effects of defaunation on feed digestibility rumen metabolism and blood metabolites. **Journal of Animal Science**, v.25, p. 765-773, 1966.
- KREHBIEL, C. R. et al. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. E120–E132, 2003.
- LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 557-564, 2003.
- LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Short communication: Feed selection by dairy cows fed individually in a tie-stall or as a group in a free-stall barn. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2386-2389, 2007.
- LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, Walter J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 87, p. 149–164, 1990.
- LUND, A. Yeasts and moulds in the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, v. 81, p. 453–462, 1974.
- M. MALEKKHAHI et al. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 213, p. 29–43, 2016.
- MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000 Research**, v. 4, p. 1–13, 2015.
- MARDEN, J. P. et al. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3528–3535, 2008.
- MCALLISTER, T. A. et al. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, p. 193–211, 2011.
- MOALLEM, U. et al. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 343–351, 2009.
- MORAN, C. A. Functional components of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* applications for yeast glucan and mannan. **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries**. p. 283–296, 2004.
- 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.
- NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 249–261, 1996.

- NG S. C. et al. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, p. 300–310, 2009.
- NOCEK, J. E. et al. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 429–433, 2002.
- NOCEK, J. E. et al. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 331–335, 2003.
- NOCEK, J. E.; KAUTZ, W.P. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 260–266, 2006.
- NOVAK, K. N. et al. Effect of supplementation with an electrolyte containing a *Bacillus*-based direct-fed microbial on immune development in dairy calves. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 427–434, 2012.
- NRC. 1981. Effect of environment on nutrient requirements of domestic animals. **National Academies Press**, Washington, DC. 168p.
- OETZEL, G. R. et al. Direct-fed microbial supplementation and health and performance of pre- and postpartum dairy cattle: A field trial. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2058–2068, 2007.
- O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T. R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 262–268, 2010.
- OH, S.; KIM, S. H.; WOROBO, R. W. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2747–2752, 2000.
- PAAPE, M. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, p. 109–121, 2002.
- PERDIGÓN, G. et al. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1108–1114, 1999.
- PINLOCHE, E. et al. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. **Plos One**, v. 8, e67824, 2013.
- PLATA, F. et al. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 49, p. 203–210, 1994.
- 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. 6027–41, 2012.
- PUNIYA, A. K. et al. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, p. 550–560, 2015.
- QIAO, G. H. et al. Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk

yield in Chinese Holstein cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 429–436, 2010.

RAETH-KNIGHT, M. L.; LINN, J. G.; JUNG, H. G. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1802–1809, 2007.

RAINARD, P. et al. Invited review: Low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 6703–6714, 2018.

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, p. 1986–1997, 2009.

RIDDELL, J. et al. Addition of a Bacillus based probiotic to the diet of preruminant calves: influence on growth, health, and blood parameters. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 8, p. 78–85, 2010.

ROMAGNANI, S. (1992). Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the “natural” immune response? **Immunology Today**, v. 13, p. 379–381, 1992.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 99–111, 2000.

SALVATI, G. et al. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 4062–4073, 2015.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeforms as human probiotics, Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 101–110, 2003.

SCHNEIDER, P. L. et al. Responses of lactating cows to dietary sodium source and quantity and potassium quantity during heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 99–110, 1986.

SCHNEIDER, P. L.; BEEDE, D. K.; WILCOX, C. J. Effects of supplemental potassium and sodium chloride salts on ruminal turnover rates, acid-base and mineral status of lactating dairy cows during heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 126–135, 1988a.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Incidence of clinical mastitis on farms with low SCC in bulk milk. **Veterinary Record**, v. 125, p. 60–63, 1989.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, p. 579–596, 2003.

SEO, J. K. et al. Direct-fed microbials for ruminant animals. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, p. 1657–1667, 2010.

SILVA, K. T. Effect of live yeast products on performance, digestion, thermoregulation, and immune response of lactating cows during summer. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2018.

- SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1851–1865, 1997.
- SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, p. 135–146, 2002.
- SOUZA, V. L. et al. Lactation performance and diet digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores. **Livestock Science**, v. 200, p. 35–39, 2017.
- SPANIOL, J. S. et al. Influence of probiotic on somatic cell count in milk and immune system of dairy cows. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, p. 677–681, 2014.
- SUN, P.; WANG, J. Q.; DENG, L. F. Effects of *Bacillus subtilis* natto on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. **Animal**, v. 7, p. 216–222, 2013.
- SURIYASATHAPORN, W. et al. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1248–1255, 2000.
- SYNGAI, G. G. et al. Probiotics - the versatile functional food ingredients. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 921–933, 2016.
- TARGOWSKI, S P. Role of immune factors in protection of mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1781–1789, 1983.
- THOM, E. C. Cooling degree days. **Air Conditioning, Heating and Ventilating**, New York, v. 55, p. 65-69, 1958.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 133–146, 2003.
- UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 570–577, 2010.
- UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and environments**, v. 30, p. 126–132, 2015.
- VALDEZ, Y.; BROWN, E. M.; FINLAY, B. B. Influence of the microbiota on vaccine effectiveness. **Trends in immunology**, v. 35, p. 526–537, 2014.
- VITETTA, L. Adjuvant probiotics and the intestinal microbiome: enhancing vaccines and immunotherapy outcomes. **Vaccines**, v. 5, p. 50, 2017.
- WIEDMEIER, R. D.; ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2063–2068, 1987.
- WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. **The rumen protozoa**. New York: Springer-Verlag, 423p, 1992.
- WINKLER, P.; GHADIMI, D.; KRAEHENBUHL, J. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 756S–772S, 2007.
- YAQOOB, P. Ageing, immunity and influenza: A role for probiotics? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 309–317, 2014.

YIRGA, H. The use of probiotics in animal nutrition. **Journal of Probiotics and Health**, v. 3, p. 132, 2015.

YOON, I. K.; STERN, M. D. Influence of DFM on ruminal fermentation and performance of ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 8, p. 533–555, 1995.

ZANELLO, G. et al. *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-Mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. **Plos One**, v. 6, e18573, 2011.

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 R. et al. Effect of oral administration of probiotics on growth performance, apparent nutrient digestibility and stress-related indicators in Holstein calves. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, p. 33–38, 2016.

ZIMBELMAN, R. 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. **Proceedings...**, p. 158–169, 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.

SEGUNDA PARTE

Artigos formatados de acordo com as normas para submissão ao periódico Arquivo

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(VERSÕES PRELIMINARES)

1 Suplementação de vacas leiteiras com bactérias e leveduras. I. Desempenho leiteiro,
2 consumo e digestão

3 (Supplementation of dairy cows with bacteria and yeast. I. Lactation performance,
4 intake, and digestion)

5
6 Letícia do Nascimento Resende¹, Rayana Brito da Silva², Carla Luiza da Silva Ávila¹,
7 Renata Apocalypse Nogueira Pereira^{2,3}, Marcos Neves Pereira^{*1,2}

8
9 ¹Universidade Federal de Lavras, Lavras 37.200-000, MG

10 ²Better Nature Research Center, Ijaci 37.218-000, MG

11 ³Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Lavras 37.200-000, MG

12 *Email: mpereira@ufla.br

13
14 RESUMO - Avaliou-se a suplementação de vacas leiteiras com aditivo líquido contendo
15 bactérias lácticas, bactérias formadoras de esporos e leveduras (CBL). Vinte e seis vacas
16 Holandesas foram alimentadas individualmente com os tratamentos controle ou CBL (3,5
17 mL/kg de matéria seca) por 56 dias. O CBL aumentou o consumo de matéria seca (23,5
18 vs 22,5 kg/d) e tendeu a aumentar a produção de leite (30,0 vs 29,4 kg/d). A relação entre
19 leite corrigido para energia e o consumo foi reduzida pelo CBL (1,25 vs 1,31). O CBL
20 tendeu a reduzir a digestibilidade aparente da matéria orgânica não-fibrosa no trato
21 digestivo total (81,2 vs 84,1%). A proporção molar de butirato no fluido ruminal tendeu
22 a ser reduzida pelo CBL (9,4 vs 10,4%), bem como a concentração de protozoários. A
23 relação entre acetato e propionato (3,1) e a síntese ruminal de proteína microbiana não
24 diferiram. O CBL reduziu a proporção do consumo diário pela manhã, aumentou a
25 proporção a tarde e reduziu o teor de N-ureico no sangue, mas não afetou o N-ureico no
26 leite. O CBL aumentou o consumo de matéria seca mais do que aumentou a produção de
27 leite, reduzindo a eficiência alimentar, e teve efeito sobre o perfil de fermentação ruminal
28 e a digestibilidade.

29 Palavras-chave: aditivo nutricional, digestibilidade, fermentação ruminal, levedura,
30 probiótico

31 ABSTRACT - This experiment evaluated the supplementation of dairy cows with a liquid
32 additive containing lactic acid bacteria, spore-forming bacteria, and yeast (CBL). Twenty-
33 six Holstein cows were individually fed treatments control or CBL (3.5 mL/kg of dry
34 matter) for 56 days. The CBL increased dry matter intake (23.5 vs 22.5 kg/d) and tended
35 to increase milk yield (30.0 vs 29.4 kg/d). The energy-corrected milk to intake ratio was
36 reduced by CBL (1.25 vs 1.31). The CBL tended to reduce the total tract apparent
37 digestibility of the non-fibrous organic matter (81.2 vs 84.1%). The molar proportion of
38 butyrate in ruminal fluid tended to be reduced by CBL (9.4 vs 10.4%), as well as protozoa
39 concentration. The acetate to propionate ratio (3.1) and ruminal microbial yield did not
40 differ. The CBL reduced the proportion of daily intake in the morning, increased the
41 proportion in the afternoon, and reduced blood urea-N, but did not affect milk urea-N.
42 The CBL increased dry matter intake more than the increase in milk yield, decreasing
43 feed efficiency, and had effects on ruminal fermentation profile and digestibility.

44 Keywords: digestibility, feed additive, probiotic, ruminal fermentation, yeast

45 INTRODUÇÃO

46 Uma definição do termo probiótico é de que são microrganismos vivos que,
47 quando suplementados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do
48 hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Aditivos alimentares baseados em probióticos são
49 coerentes à tendência naturalista dos consumidores de produtos de origem animal.
50 Produtos microbianos à base de bactérias produtoras ou utilizadoras de ácido lático,
51 bactérias formadoras de esporos e leveduras têm sido utilizados para ruminantes (Seo et
52 al., 2010). Os produtos comerciais podem compreender apenas uma espécie de
53 microrganismo ou podem conter várias espécies e cepas em uma mistura. A utilização de
54 misturas visa obter ação mais ampla em diferentes espécies de animais (Fuller, 1989) ou
55 buscar o efeito sinérgico entre os microrganismos, o que pode potencializar a atuação do
56 produto (Timmerman et al., 2004). A combinação de microrganismos pode ser adotada
57 visando a produção de aditivos microbianos multi-funcionais.

58 Produtos microbianos à base de leveduras têm sido tradicionalmente utilizados em
59 ruminantes adultos para reduzir o acúmulo ruminal de ácido lático e estabilizar o pH do
60 fluído, melhorar a digestibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, induzir ganho em
61 desempenho leiteiro e/ou eficiência alimentar (Desnoyers et al., 2009). Bactérias

62 produtoras de ácido lático (BAL), como espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus*, podem
63 estimular o crescimento de microrganismos utilizadores de ácido lático e estabilizar o pH
64 ruminal (Nocek et al., 2002). Microrganismos produtores de lactato também poderiam
65 promover a produção de propionato ruminal por microrganismos utilizadores de lactato,
66 aumentando a eficiência energética da fermentação ruminal (Krehbiel et al., 2003).
67 Bactérias formadoras de esporos, como *Bacillus subtilis*, aumentaram a produção de leite
68 de vacas com alta contagem de células somáticas no leite, mas o mecanismo da resposta
69 não envolveu ganho em digestibilidade (Souza et al., 2017). Assume-se que este tipo de
70 probiótico teria vantagem por serem resistentes ao manuseio na fazenda e ao aquecimento
71 em fábricas de rações, além de serem resistentes à digestão ácida no abomaso de bovinos.

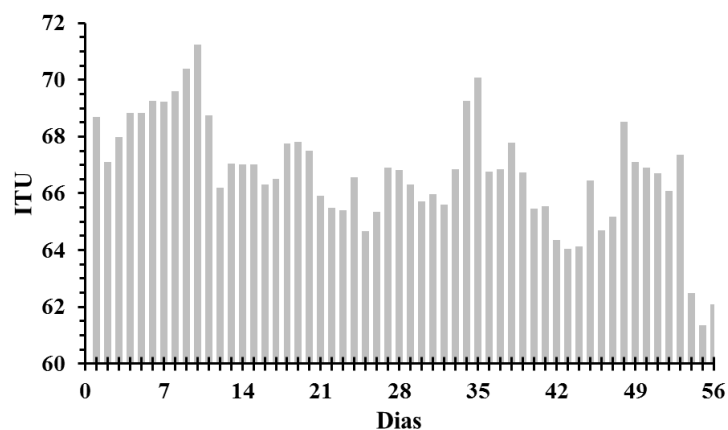
72 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de uma mistura bactérias lácticas,
73 bactérias formadoras de esporos e leveduras cultivadas em consórcio sobre o desempenho
74 leiteiro, o consumo de matéria seca (CMS), a digestibilidade de nutrientes, o
75 comportamento de ingestão e ruminação e o perfil de fermentação ruminal de vacas em
76 lactação. Nossa hipótese foi a de que os microrganismos suplementados pela dieta
77 atuariam positivamente sobre a digestibilidade, o desempenho leiteiro e a eficiência
78 alimentar por efeito modulador da fermentação ruminal. O efeito da mistura probiótica
79 sobre a temperatura corporal e a imunidade será apresentado em artigo subsequente.

80 MATERIAL E MÉTODOS

81 O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais
82 da Universidade Federal de Lavras (075/17). O experimento foi conduzido de 3 de abril
83 a 11 de junho de 2017 em instalação do tipo tie-stall com camas de areia que permite a
84 alimentação individualizada dos animais. Dois dataloggers (EasyLog-USB-2-LCD,
85 Lascar Electronics, Salisbury, Reino Unido) foram fixados a 2,5 m do chão no centro da
86 instalação para registrar a temperatura e a umidade do ambiente em intervalos de 30 min
87 durante os 56 dias do período experimental de aplicação dos tratamentos. O Índice de
88 Temperatura-Umidade (ITU) foi calculado (Yousef, 1985): $ITU = T + 0,36 \times DP + 41,2$,
89 onde T = temperatura (°C) e DP = ponto de orvalho (°C) (Fig.1).

90 Vinte e seis vacas Holandesas (185 ± 141 dias em lactação, 7 primíparas) foram
91 alimentadas com a mesma dieta por um período de padronização de 14 dias. Nos dias 11
92 a 14 desse período, o CMS, a produção de leite, o teor e a produção de sólidos do leite, o
93 teor de N-ureico do leite, o peso vivo (PV) e o escore de condição corporal (ECC) foram

94 mensurados e utilizados como covariável no modelo estatístico. As vacas foram blocadas
 95 em pares primariamente por paridade ($1 \text{ vs } \geq 2$) e secundariamente pela produção de leite
 96 e alocadas a um tratamento por 56 dias: Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e
 97 Leveduras (CBL. 3,5 mL/kg de matéria seca da dieta. Global Saúde, Pouso Alto,
 98 Brasil/SCD Probiotics, Kansas City, EUA). A mistura de microrganismos foi adicionada
 99 à dieta total em um vagão misturador estacionário. As dietas foram fornecidas às 07:00 e
 100 13:00 h em quantidade para obter 7 a 10% de sobra diária por vaca.



101
 102 Figura 1. Índice de Temperatura-Umididade (ITU) durante o experimento. 2688 registros
 103 com intervalos de 30-min. Média \pm desvio padrão: ITU: $66,8 \pm 4,79$; temperatura: $19,7 \pm$
 104 $4,1^\circ\text{C}$; umidade: $82,7 \pm 11,8\%$. Proporção de ITU > 68 : 37,2% do tempo.

105 De acordo com o fabricante, o produto líquido era composto por *Bacillus subtilis*,
 106 *Bifidobacterium animalis*, *Enterococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*
 107 *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, e outros microrganismos não
 108 relatados. O produto foi confeccionado 1 semana antes do início do período experimental
 109 de coleta de dados. Duas amostras compostas foram formadas a partir de sub-amostras de
 110 6 galões contendo 21 L do produto. Uma amostra foi analisada no início do período
 111 experimental e a outra amostra foi mantida no ambiente de armazenamento da fazenda e
 112 analisada no final do experimento. A concentração de BAL foi mensurada por
 113 plaqueamento em meio Ágar De Man Rogosa e Sharpe (MRS - HiMedia Laboratories,
 114 Mumbai, Índia) com nistatina (4 mL/L) e cultivo a 37°C por 72 h. As leveduras viáveis
 115 foram enumeradas em meio de Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC - Difco,
 116 Becton Dickinson, Sparks, EUA) e cultivo a 28°C por 72 h. A concentração de bactérias
 117 aeróbicas formadoras de esporos foi mensurada em amostras submetidas a choque
 118 térmico de 80°C por 10 min e plaqueadas em Ágar Nutriente (NA - HiMedia Laboratories,
 119 Mumbai, Índia) e cultivo a 30°C por 72 h.

120 O CMS foi obtido pela mensuração da dieta oferecida e sobras diárias por vaca.
121 Amostras de ingredientes e sobras foram obtidas diariamente e congeladas para a
122 formação de amostras compostas por semana. As amostras compostas foram secas em
123 estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e moídas em peneira com crivos de 1 mm
124 de diâmetro (Wiley, Thomas Scientific, Swedesboro, EUA). O teor de matéria seca (MS)
125 foi determinado por secagem a 105°C por 24 h e as cinzas por incineração a 550°C por 6
126 h. O extrato etéreo (EE) e a proteína bruta (PB) foram analisados de acordo com AOAC
127 (2012). O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi analisado em cadinhos porosos
128 segundo Van Soest et al. (1991) com amilase e sulfito de sódio. A fração de carboidrato
129 não fibrosos foi calculada: $100 - (PB + EE + cinzas + FDN)$. O amido foi analisado de
130 acordo com Hall (2009). A distribuição de partículas foi mensurada com o separador de
131 partículas da *Penn State* (Lammers et al., 1996). As dietas são relatadas na Tab. 1.

132 As vacas foram ordenhadas 3 x/d iniciando às 05:00, 13:00 e 20:00 h e a produção
133 de leite foi mensurada diariamente. Amostras de leite foram coletadas nos dias 6 e 7 de
134 cada semana experimental (1 a 8). As amostras foram armazenadas em frascos contendo
135 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e mantidas sob refrigeração por no máximo 2 dias até
136 serem enviados para um laboratório comercial (Laboratório Centralizado da Associação
137 Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba, Brasil). As
138 concentrações de sólidos e N-ureico no leite foram analisadas por espectrometria de
139 infravermelho (Bentley Instruments Inc., Chaska, EUA). A secreção de energia do leite
140 (Leite E; Mcal/d) foi calculada segundo NRC (National..., 2001): $(0,0929 \times \% \text{ de gordura}$
141 $+ 0,0547 \times \% \text{ de proteína} + 0,0395 \times \% \text{ de lactose}) \times \text{kg de leite}$. A secreção de leite
142 corrigido para energia (kg/d) foi calculada: $\text{Leite E}/0,70$ (assumindo 0,70 Mcal/kg de leite
143 com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose). O leite corrigido para 4% de
144 gordura (kg/d) foi calculado com a equação de Gaines (NRC, 2001): $0,4 \times \text{kg de leite} +$
145 $15 \times \text{kg de gordura}$. O PV dos animais foi obtido nos dias 4 e 5 de cada semana
146 experimental e o ECC (1 a 5, magra a gorda) foi mensurado em intervalos de 14 dias. O
147 PV foi mensurado após a ordenha matinal e o ECC por três avaliadores independentes.

148

149 Tabela 1. Composição da dieta experimental em ingredientes e nutrientes (% da matéria
 150 seca) e distribuição do tamanho de partículas (% da matéria natural) nos tratamentos
 151 Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL)

	CTL	CBL
Silagem de milho	46,2	
Feno de aveia	3,7	
Caroço de algodão	11,2	
Milho reidratado e ensilado	9,7	
Milho finamente moído	9,4	
Farelo de soja	12,7	
Farelo de soja de baixa degradabilidade no rúmen ¹	4,2	
Premix ²	2,9	
Proteína bruta (PB)	16,6	16,6
Fibra em detergente neutro (FDN)	34,3	34,3
Extrato etéreo (EE)	4,7	4,7
Cinzas	5,6	6,1
Amido	29,1	29,0
Carboidratos não fibrosos ³	38,8	38,6
Partículas > 19 mm ⁴	6,2 ± 0,9	7,6 ± 1,4
Partículas 8 a 19 mm	41,3 ± 0,9	40,0 ± 0,7
Partículas < 8 mm	52,5 ± 1,4	52,4 ± 1,4

152 ¹Soypass (Cargill, Uberlândia, Brasil)

153 ²33,4% calcário, 33,3% bicarbonato de sódio, 8,3% óxido de magnésio, 8,3% NaCl, e 16,7% minerais e vitaminas (18,5% Ca; 15,0%
 154 P; 3,0% Mg; 3,0% S; 240 ppm Co; 3.000 ppm Cu; 8.000 ppm Mn; 12.000 ppm Zn; 90 ppm Se; 180 ppm I; 8.000 KUI/kg Vit. A;
 155 2.000 KUI/kg Vit. D; 50 KUI/kg Vit. E)

156 ³100 - (PB + FDN + EE + Cinzas)

157 ⁴Separador de partículas da *Penn State*. Média ± desvio padrão de 8 amostras semanais

158 A digestibilidade aparente do trato digestivo total da MS, matéria orgânica (MO),
 159 FDN, MO não-FDN e amido foi determinada por coleta total de fezes nos dias 54 a 56.
 160 As fezes foram coletadas durante três períodos de amostragem de 8 h. O início de cada
 161 período de coleta foi atrasado em 8 h a cada novo dia, visando obter uma amostra
 162 representativa das 24 h. As alíquotas fecais foram imediatamente congeladas e foi
 163 formada uma amostra composta por vaca. As amostras de fezes foram desidratadas a 55°C
 164 por 72 h em estufa de ventilação forçada. As concentrações de MS, cinzas, FDN e amido
 165 foram determinadas como descrito anteriormente.

166 A viscosidade fecal foi determinada nas mesmas amostras utilizadas para a
 167 determinação da digestibilidade por adaptação da metodologia de Cannon et al. (2010).
 168 Amostras de 100 g de fezes frescas foram diluídas em 120 mL de água destilada. A
 169 solução foi homogeneizada com uma espátula metálica durante 30 s e filtrada através de
 170 uma peneira. A viscosidade da solução foi mensurada com um viscosímetro rotacional
 171 (Modelo DV-E. Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, EUA) a 100 rpm à
 172 temperatura ambiente.

173 A síntese relativa de proteína microbiana no rúmen foi estimada pela excreção de
 174 alantoína na urina (mmol/d). O volume urinário foi mensurado por coleta total
 175 simultaneamente à coleta de fezes. Durante o período de coleta a urina foi acrescentada a

176 uma solução de ácido sulfúrico a 20% e ao final as amostras foram diluídas 1:5 com
177 solução de ácido sulfúrico a 4% e congeladas a -20°C. A alantóina foi analisada de acordo
178 com Chen e Gomes (1992).

179 Amostras de fluido ruminal foram coletadas 11 h e 52 min \pm 26 min após a
180 alimentação matinal no dia 56 com uma sonda oro-gástrica flexível conectada a uma
181 bomba de vácuo. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido para estagnar a
182 fermentação ruminal e posteriormente armazenada a -20°C até a análise de ácidos graxos
183 voláteis por HPLC (Waters Alliance, 2998 PDA detector, Milford, EUA). As condições
184 de análise foram descritas em Ferreira et al. (2016). Outra amostra foi adicionada à uma
185 solução de formaldeído a 36% (1:1) para contagem de protozoários. A amostra foi corada
186 de acordo com Dehority (1984) e o total de protozoários foi enumerado com um
187 microscópio óptico em uma câmara de Neubauer.

188 A atividade mastigatória foi avaliada no dia 51. As atividades bucais (ingestão de
189 alimentos, ingestão de água, ruminação e ócio) foram registradas em intervalos de 5 min
190 por 24 h. A ingestão e ruminação por unidade de CMS foram calculadas utilizando a
191 ingestão do dia em que a atividade de mastigação foi avaliada. Uma refeição foi definida
192 por pelo menos dois eventos consecutivos de ingestão de 5 min após pelo menos 10 min
193 de ociosidade ou ruminação. A duração da refeição foi determinada como a relação entre
194 o tempo de ingestão (min/d) e as refeições/d. O tamanho da refeição foi determinado pelo
195 CMS dividido pelas refeições/d. A duração da primeira refeição diária (refeição
196 condicionada) foi medida com um cronômetro durante os dias 52 e 53. Três avaliadores
197 observaram o comportamento de todas as vacas após o fornecimento da dieta às 07:00 h
198 até o término da primeira refeição.

199 Nos dias 52 e 53, a proporção do consumo diário de manhã (07:00 a 13:00 h), à
200 tarde (13:00 a 19:00 h) e à noite (19:00 a 07:00 h) foi determinada medindo a
201 disponibilidade de alimento às 07:00, 13:00, e 19:00 h e de sobras às 13:00, 19:00 e 07:00
202 h. O comportamento de seleção de partículas, FDN e amido foi avaliado no dia 52. A
203 proporção de partículas acima da peneira de 19 mm e acima e abaixo da peneira de 8 mm
204 do separador de partículas da *Penn State* foi avaliado às 07:00 e 13:00 h para a dieta
205 oferecida e às 13:00, 19:00 e 07:00 h para as sobras. As sobras da dieta às 13:00 h foram
206 misturadas com a dieta oferecida às 13:00 h para a determinação do tamanho de partícula
207 da dieta oferecida. O consumo predito de partículas em cada peneira foi (base na matéria

208 natural): % da dieta retida na peneira \times kg de dieta consumida. O consumo observado de
209 partículas foi: % da dieta retida na peneira \times kg de dieta oferecida – % da sobra retida na
210 peneira \times kg de sobra. Para a seleção por FDN e amido o consumo predito do nutriente
211 foi: % do nutriente na MS da dieta oferecida \times kg de CMS. O consumo observado foi: %
212 do nutriente na MS da dieta oferecida \times kg de MS da dieta oferecida - % do nutriente na
213 MS da sobra \times kg de MS de sobra. O índice de seleção foi: $100 \times$ consumo
214 observado/consumo predito. Valores de seleção abaixo de 100% representam rejeição,
215 acima de 100% representam preferência e igual a 100% representam ausência de seleção.

216 No dia 48 foram obtidas amostras de sangue dos vasos coccígeos para análise de
217 N-ureico no plasma (Ureia 500. Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brasil).
218 Amostras foram obtidas ao término de cada ordenha e duas horas depois em tubos
219 vacutainer contendo EDTA. O plasma foi obtido por centrifugação a $1.800 \times g$ por 10
220 min e armazenado a -20°C até análise.

221 Os dados obtidos ao longo do tempo foram analisados com o PROC MIXED do
222 SAS (Statistical..., 2011). Os dados de uma vaca multípara no tratamento CBL foram
223 descartados devido a uma úlcera de abomaso. O modelo estatístico continha o efeito
224 contínuo de covariável (medida da mesma variável no final do período de padronização),
225 o efeito aleatório do bloco (1 a 13), os efeitos fixos de tratamento (CTL ou CBL) e tempo
226 (dia, semana ou hora), e a interação entre tratamento e tempo. Vaca aninhada em
227 tratamento foi definido como medida de erro para testar o efeito de tratamento. Para cada
228 variável, a melhor estrutura de covariância foi definida pelo critério Bayesiano de
229 Schwarz entre autoregressiva de primeira ordem e simetria composta. Os graus de
230 liberdade foram calculados usando a opção Kenward-Roger. Modelo similar foi utilizado
231 para variáveis mensuradas uma vez durante o experimento e para as variáveis sem ajuste
232 da covariável, removendo a covariável, tempo e sua interação com tratamento do modelo
233 anterior. A significância foi declarada a $P \leq 0,05$ e as tendências a $0,05 < P \leq 0,10$.

234

RESULTADOS

235 As contagens de microrganismos viáveis no produto nas semanas 1 e 8 do
236 experimento foram, respectivamente (UFC/mL): $1,7 \times 10^8$ e $9,6 \times 10^6$ de BAL; $3,5 \times 10^5$
237 e $2,0 \times 10^3$ de bactérias aeróbicas formadoras de esporos; e $1,0 \times 10^5$ e 0 de leveduras
238 totais; $2,0 \times 10^3$ e 0 de leveduras de brotamento; e $1,0 \times 10^5$ e 0 de leveduras de fissão.

239 Na Tab. 2 estão relatados o CMS, o desempenho leiteiro, a eficiência alimentar, o
 240 PV e o ECC. A suplementação com CBL induziu ganho em CMS (+ 1,1 kg/d; $P < 0,01$)
 241 e tendeu a aumentar as produções de leite (+ 0,6 kg/d; $P = 0,06$) e de lactose (+ 0,060
 242 kg/d; $P = 0,09$). O maior aumento no CMS comparado ao aumento na produção de leite
 243 reduziu ($P = 0,02$) a eficiência alimentar, mensurada pela relação entre a secreção diária
 244 de leite corrigido para energia e o CMS. O tratamento CBL tendeu ($P = 0,08$) aumentar
 245 o ECC comparado ao tratamento CTL, mas não teve efeito ($P = 0,27$) sobre o PV. O
 246 ganho em leite não foi associado à variação no ITU (Fig. 1 e 2). O maior ganho em
 247 consumo ocorreu a nas semanas 4 e 5 e o ganho em leite ocorreu nas semanas 3 e 4 do
 248 período de comparação (Fig. 2 e 3).

249 A digestibilidade aparente dos nutrientes no trato total, a excreção de alantoína na
 250 urina e a viscosidade fecal estão relatados na Tab. 3. Houve tendência ($P = 0,08$) de
 251 redução na digestibilidade aparente da MO não-FDN com a suplementação de CBL, sem
 252 afetar ($P \geq 0,20$) a digestibilidade da FDN e do amido. O consumo de matéria orgânica
 253 digestível foi similar ($P = 0,29$), apesar do aumento numérico de + 1 kg/d nas vacas do
 254 CBL. Não houve efeito de tratamento ($P \geq 0,21$) sobre a síntese de proteína microbiana
 255 no rúmen, estimada pela excreção de alantoína na urina, e a viscosidade das fezes.

256 Tabela 2. Consumo de matéria seca (CMS), desempenho leiteiro, contagem de células
 257 somáticas (CCS), nitrogênio ureico no leite (NUL), escore de condição corporal (ECC) e
 258 peso vivo (PV) nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras
 259 (CBL)

	Tratamentos			Valor-P	
	CTL	CBL	EPM ¹	Tratamento	Tratamento × Tempo
CMS, ² kg/d	22,4	23,5	0,37	< 0,01	0,88
Leite, ² kg/d	29,4	30,0	0,50	0,06	0,72
LCG 4%, ³⁵ kg/d	27,0	27,5	0,72	0,64	0,59
LCE, ³⁶ kg/d	28,5	28,6	0,65	0,93	0,68
Gordura, ³ kg/d	1,021	1,041	0,0232	0,55	0,57
Gordura, ³ %	3,53	3,48	0,045	0,40	0,57
Proteína, ³ kg/d	0,897	0,920	0,0220	0,46	0,32
Proteína, ³ %	3,10	3,07	0,031	0,42	0,20
Lactose, ³ kg/d	1,314	1,374	0,0237	0,09	0,36
Lactose, ³ %	4,51	4,54	0,027	0,45	0,43
Sólidos, ³ kg/d	3,523	3,629	0,0682	0,28	0,41
Sólidos, ³ %	12,16	12,05	0,075	0,30	0,35
Leite/CMS ²	1,36	1,32	0,035	0,14	0,99
LCE/CMS ²	1,31	1,25	0,033	0,02	0,99
NUL, ³ mg/dL	18,8	18,4	0,443	0,47	0,99
ECC, ⁴ 1 a 5	2,91	3,02	0,039	0,08	0,16
PV, ³ kg	639	643	2,9	0,27	0,93

260 ¹Erro padrão das médias

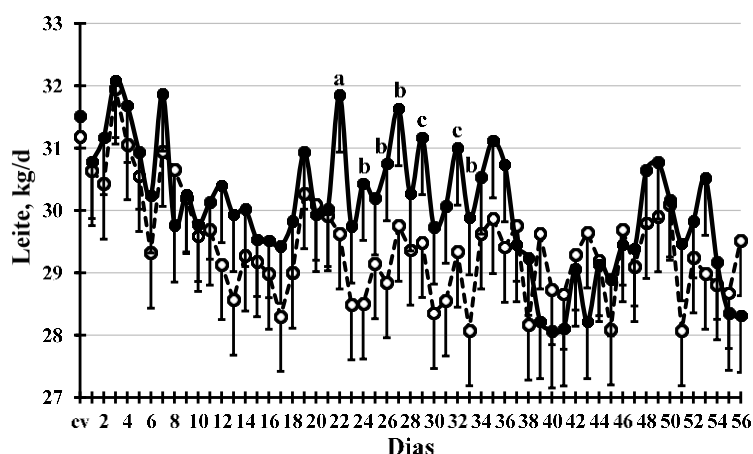
261 ² $P \leq 0,05$ para efeito fixo de dia (1 a 56)

262 ³ $P \leq 0,05$ para efeito fixo de semana (1 a 8)

263 ⁴ $P \leq 0,05$ para efeito fixo de dia (0, 14, 28, 42 e 56)

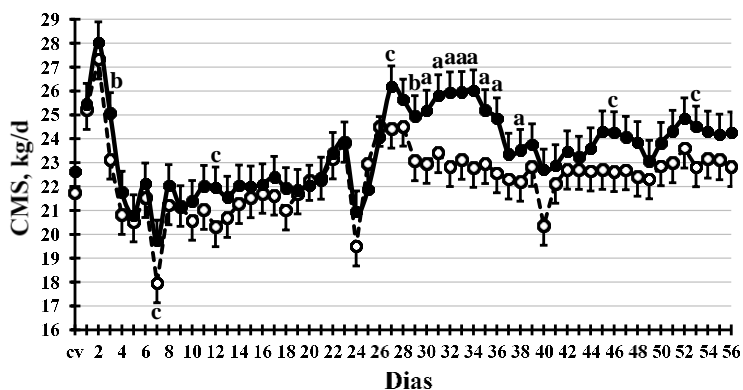
264 ⁵Leite corrigido para 4 % de gordura

265 ⁶Leite corrigido para energia



266

267 Figura 2. Produção de leite (Leite) nos tratamentos Controle (---○---) ou Consórcio de
 268 Bactérias e Leveduras (—●—). $P = 0,06$ para efeito fixo de tratamento, $P < 0,01$ para
 269 efeito fixo de dia e $P = 0,72$ para interação entre tratamento e dia. Covariável (cv): $P =$
 270 $0,60$. Opção *Slice* do SAS: $^aP \leq 0,05$, $^bP \leq 0,10$ e $^cP \leq 0,15$.



271

272 Figura 3. Consumo de matéria seca (CMS) nos tratamentos Controle (---○---) ou
 273 Consórcio de Bactérias e Leveduras (—●—). $P < 0,01$ para efeito fixo de tratamento, $P <$
 274 $0,01$ para efeito fixo de dia e $P = 0,88$ para interação entre tratamento e dia. Covariável
 275 (cv): $P = 0,50$. Opção *Slice* do SAS: $^aP \leq 0,05$, $^bP \leq 0,10$ e $^cP \leq 0,15$.

276 Tabela 3. Digestibilidade aparente no trato digestivo total (% do consumido) da matéria
 277 seca (DMS), matéria orgânica (DMO), fibra em detergente neutro (DFDN), matéria
 278 orgânica não FDN (DMO não-FDN) e amido (DAmido), excreção de alantoína na urina
 279 e viscosidade fecal nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e
 280 Leveduras (CBL)

	CTL	CBL	EPM ¹	Valor- <i>P</i>
CMOD, ² kg/d	15,0	16,0	0,69	0,29
LCE/CMOD	1,99	1,77	0,113	0,15
DMS	67,3	68,4	1,52	0,62
DMO	69,9	70,0	1,31	0,94
DFDN	46,3	50,4	2,17	0,20
DMO não-FDN	84,1	81,2	1,11	0,08
DAmido	91,3	90,0	0,94	0,87
Alantoína, mmol/d	491	567	42,1	0,21
Alantoína/CMOD, mmol/kg	33,2	35,7	2,58	0,49
Viscosidade fecal, cP	72,4	76,7	42,29	0,66

281

¹Erro padrão das médias

282

²Consumo de matéria orgânica digestível

283 O perfil de fermentação e a concentração de protozoários no fluido ruminal estão
 284 na Tab. 4. A proporção molar de butirato tendeu ser menor ($P = 0,06$) no tratamento CBL
 285 comparado ao CTL. Não foi observado efeito de tratamento ($P \geq 0,18$) sobre a proporção
 286 molar de acetato, propionato, valerato, isobutirato, metil-butirato e a relação entre acetato
 287 e propionato. Houve tendência de redução ($P = 0,10$) na concentração de protozoários no
 288 fluido ruminal com a suplementação de CBL.

289 Tabela 4. Proporção molar de ácidos graxos voláteis (% do total) e concentração de
 290 protozoários no fluido ruminal nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de
 291 Bactérias e Leveduras (CBL)

	CTL	CBL	EPM ¹	Valor- <i>P</i>
Acetato	63,9	65,0	0,81	0,35
Propionato	21,1	21,1	0,84	0,98
Butirato	10,4	9,4	0,40	0,06
Valerato	1,5	1,4	0,05	0,18
Isobutirato	1,0	1,0	0,03	0,42
Metil-butirato ²	2,3	2,3	0,09	0,96
Acetato/Propionato	3,1	3,1	0,14	0,89
Protozoários, x 10 ⁴ /mL	11,10	8,07	1,706	0,10

292 ¹Erro padrão das médias

293 ²Soma de 3-metil e 2-metil-butirato com coeluição

294 Não houve efeito de tratamento ($P \geq 0,16$) sobre o comportamento de ingestão e
 295 ruminação (Tab. 5). As vacas que receberam o CBL reduziram a proporção do consumo
 296 pela manhã ($P = 0,02$) e aumentaram a proporção do consumo no período da tarde ($P =$
 297 0,03).

298 Tabela 5. Comportamento de ingestão e ruminação e proporção do consumo ao longo do
 299 dia nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL)

	CTL	CBL	EPM ¹	Valor- <i>P</i>
Ingestão, min/d	322	318	22,3	0,82
Ruminação, min/d	474	486	25,0	0,73
Mastigação, ² min/d	796	800	37,8	0,92
Ingestão, min/kg CMS	14,7	13,1	1,29	0,16
Ruminação, min/kg CMS	20,9	20,3	1,22	0,71
Mastigação, min/kg CMS	35,6	33,3	2,23	0,32
Refeições/d	8,3	8,7	0,48	0,45
Consumo por refeição, kg de MS	2,9	2,9	0,22	0,80
Intervalo entre refeições, min	150	171	16,9	0,30
Duração da refeição, min	41	38	3,8	0,33
Duração da primeira refeição, min	61	56	6,7	0,55
07:00 às 13:00 h, % do consumo diário	40,4	35,1	1,52	0,02
13:00 às 19:00 h, % do consumo diário	41,9	45,9	1,23	0,03
19:00 às 07:00 h, % do consumo diário	17,7	19,0	1,90	0,61

300 ¹Erro padrão das médias

301 ²Ingestão + ruminação

302 O comportamento de seleção de partículas da dieta é relatado na Tab. 6. A
 303 suplementação com CBL tendeu ($P = 0,06$) induzir maior seleção por partículas finas da
 304 dieta pela manhã, mas não afetou ($P \geq 0,13$) a seletividade de partículas nos outros
 305 períodos do dia.

306 Tabela 6. Comportamento de seleção de partículas, de amido e de fibra em detergente
 307 neutro (FDN) (observado/predito, %) e sobra como proporção do oferecido em períodos
 308 do dia nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL)

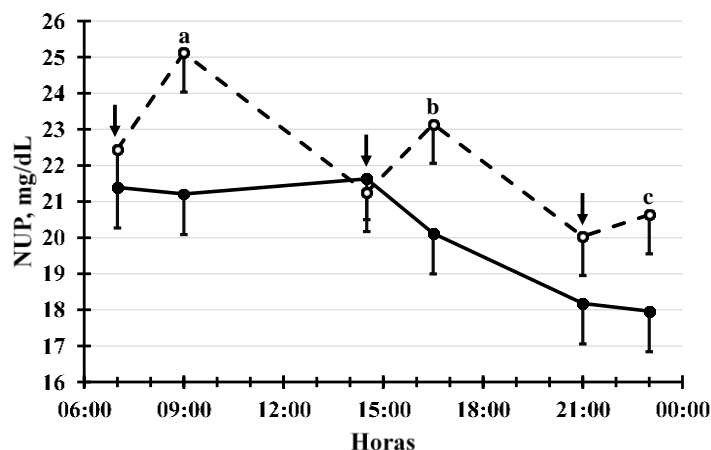
	CTL	CBL	EPM ¹	Valor- <i>P</i>
07:00 às 13:00 h ²				
> 19 mm	57	69	6,7	0,20
8 a 19 mm	96	94	1,1	0,13
< 8 mm	108	110	1,2	0,06
13:00 às 19:00 h ²				
> 19 mm	61	62	7,6	0,90
8 a 19 mm	99	99	1,1	0,98
< 8 mm	108	108	1,4	0,84
19:00 às 07:00 h ²				
> 19 mm	64	59	12,0	0,79
8 a 19 mm	97	100	3,1	0,56
< 8 mm	119	123	4,3	0,49
Amido	100	102	1,0	0,43
FDN	95	95	0,7	0,72
Sobra, % do oferecido				
07:00 às 13:00 h	42,6	43,5	3,83	0,87
13:00 às 19:00 h	43,2	42,4	3,16	0,87
19:00 às 07:00 h	51,4	47,2	4,75	0,54
Diário ³	14,8	14,4	1,26	0,80

309 ¹Erro padrão das médias

310 ²< 100% = rejeição, > 100% = consumo preferencial, 100% = ausência de seleção. Peneiras do separador de partículas da *Penn State*

311 ³Sobra diária = (sobra às 0700 h/dieta total oferecida no dia) × 100

312 O tratamento CBL reduziu ($P < 0,01$) a concentração de N-ureico no plasma às
 313 09:00 h e tendeu ($P \leq 0,09$) a reduzir às 16:30 e às 23:00 h (Fig. 4). O teor de N-ureico
 314 no leite ($P = 0,47$) não diferiu entre tratamentos (Tab. 2).



315

316 Figura 4. Concentração de nitrogênio no plasma (NUP) nos tratamentos Controle (---○---
 317) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (—●—). Setas: 07:00, 14:30 e 21:00 h
 318 imediatamente pós ordenha, 09:00, 16:30 e 23:00 h duas horas após a ordenha Valor
 319 médio ± erro padrão da média: Controle (22,1 ± 0,78) e Consórcio de Bactérias e
 320 Leveduras (20,1 ± 0,82). $P = 0,08$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de hora
 321 e $P = 0,14$ para interação entre tratamento e hora. Opção *Slice* do SAS: ^a $P = 0,01$, ^b $P =$
 322 0,06 e ^c $P = 0,09$.

323

DISCUSSÃO

324 O produto microbiano não teve composição constante ao longo do período
325 experimental. A concentração de bactérias e leveduras viáveis caiu entre as semanas 1 e
326 8. Essa queda pode ter ocorrido em decorrência de uma redução de substrato disponível
327 e da formação de produtos inibitórios pelos próprios microrganismos ao longo do período
328 de armazenamento do produto. O produto foi caracterizado como uma mistura de
329 probióticos, entretanto a dose consumida de cada microrganismo não pôde ser
330 precisamente definida e aparentemente houve baixo consumo de leveduras.

331 O tratamento CBL reduziu a eficiência alimentar (LCE/CMS), por indução de
332 aumento maior no CMS do que na produção de leite. O ganho em produção de leite pode
333 ter sido direcionado pela maior secreção de lactose, um reconhecido regulador osmótico
334 na secreção mamária (Peaker, 1975), desde que a produção de lactose no leite tendeu a
335 ser aumentada no tratamento CBL. O aumento acentuado na produção de leite (dias 22 a
336 33) ocorreu anteriormente ao aumento acentuado no CMS (dias 27 a 38), sugerindo que
337 o aumento no CMS foi uma consequência do aumento na demanda metabólica para
338 lactação. Este resultado difere do obtido na metanálise de Desnoyer et al. (2009) sobre
339 suplementação de ruminantes (bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos) com produtos à
340 base de leveduras (157 experimentos, 376 tratamentos), onde o ganho em produção de
341 leite (+ 1,2 g/kg de PV) foi superior ao ganho em CMS (+ 0,44 g/kg de PV). Na metanálise
342 de Poppy et al. (2012) sobre o efeito de um produto baseado em leveduras mortas e seu
343 meio de cultivo (36 experimentos, 69 tratamentos) também foi observado maior resposta
344 em produção de leite do que em consumo de vacas leiteiras. Neste estudo (Poppy et al.,
345 2012) o ganho em produção de leite em resposta ao prebiótico foi de 1,18 kg/d e o CMS
346 foi aumentado pelo aditivo em vacas em início da lactação (+ 0,62 kg/d) e foi reduzido
347 em vacas em meio-final da lactação (- 0,78 kg/d). A divergência entre o padrão de
348 resposta em produção de leite e CMS entre as metanálises avaliando a suplementação
349 com leveduras e este experimento, sugere que a resposta animal neste experimento foi
350 majoritariamente direcionada pela suplementação com bactérias e/ou o meio de cultivo,
351 o que é coerente à baixa contagem de leveduras no produto analisado.

352 O volume de informação sobre o efeito de probióticos bacterianos no desempenho
353 de ruminantes é bem menor que o disponível para leveduras. Krehbiel et al. (2003)
354 concluíram com base em 5 experimentos (todos publicados apenas como resumo) onde
355 avaliou-se a resposta em desempenho de vacas em lactação à suplementação com

356 bactérias ou bactérias associadas a fungos que pode ocorrer ganho em produção de leite
357 de 0,75 a 2,0 kg/d ao uso de probióticos bacterianos, mas espera-se pouco efeito sobre a
358 composição do leite, similarmente ao observado neste experimento.

359 O ganho em produção de leite e CMS no tratamento CBL não foi associado a
360 diferença acentuada na digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total. A
361 mistura de microrganismos tendeu a reduzir a digestibilidade da MO não-FDN, sem afetar
362 a digestibilidade do amido e da MO. Desde que o perfil proteico e lipídico das dietas CTL
363 e CBL eram semelhantes, supõe-se que a menor digestibilidade da MO não-FDN pode
364 ter decorrido de queda na digestão ruminal da fibra solúvel (pectina) ou de açúcares.
365 Menor digestão ruminal da MO não-FDN é coerente à tendência de queda na proporção
366 molar de butirato dentre o total de ácidos graxos voláteis, já que este ácido é um produto
367 esperado da fermentação ruminal de açúcares (Vallimont et al., 2004). Açúcares presentes
368 no meio de cultivo dos microrganismos podem ter tido menor digestibilidade que os
369 açúcares presentes na dieta basal, induzido a queda na digestibilidade da MO não-FDN
370 no tratamento CBL, sem afetar a digestibilidade de outros carboidratos da dieta, apesar
371 de ter havido aumento numérico ($P = 0,20$) biologicamente significativo (+ 4,1 unidades
372 de %) na digestibilidade da FDN. A suplementação de vacas leiteiras com leveduras
373 reduziu butirato no rúmen (Salvati et al., 2015). Também houve tendência de queda na
374 concentração de protozoários no rúmen no CBL, coerente à menor fermentação ruminal
375 de açúcares (Mackie et al., 1978). Hristov et al. (2001) observaram que a concentração
376 de protozoários no rúmen tem correlação positiva com a concentração de butirato no
377 fluído. Menor concentração de protozoários no fluido ruminal é uma explicação plausível
378 para a queda no N-ureico no plasma no CBL, provavelmente por menor proteólise e
379 reciclagem de N no rúmen (Veira, 1986). Não houve evidência de efeito do tratamento
380 sobre a eficiência energética da fermentação ruminal mensurada pela relação entre os
381 ácidos acético e propiônico ou sobre a síntese de proteína microbiana, apesar de ter
382 ocorrido aumento numérico ($P = 0,21$) na excreção urinária de alantoína no CBL. A
383 variação na digestibilidade da MO não-FDN, no perfil de fermentação ruminal e na
384 concentração de protozoários em resposta ao CBL tiveram baixo suporte estatístico,
385 questionando a relevância destes fatores como determinantes do ganho em produção de
386 leite e CMS. Estes achados são coerentes aos de Raeth-Knight et al. (2007) e Souza et al.

387 (2017) que avaliaram o efeito sobre a digestão da suplementação de probióticos
388 bacterianos para vacas leiteiras.

389 A similaridade entre tratamentos na fermentação ruminal e na digestibilidade é
390 coerente à ausência de efeito de tratamento sobre a atividade de ruminação e a
391 seletividade por partículas, amido e FDN da dieta. Entretanto, houve efeito significativo
392 de tratamento sobre a proporção do consumo diário nos períodos do dia. Vacas no
393 tratamento CBL consumiram menos pela manhã e consumiram mais a tarde que as vacas
394 no CTL, sem haver diferença na duração da primeira refeição. Similaridade na duração
395 da primeira refeição é coerente à semelhança na proporção molar de propionato ruminal
396 entre tratamentos. Propionato é um importante regulador de saciedade em ruminantes
397 (Allen, 2000). Santos et al. (2017) observaram que vacas leiteiras alimentadas com
398 silagem de cana inoculada com *Lactobacillus hilgardii* ou *L. buchneri* tiveram maior
399 proporção de butirato na fermentação ruminal, maior proporção do consumo diário pela
400 manhã e aumento na duração da primeira refeição, sem ocorrer diferença na duração dos
401 comportamentos de ingestão e ruminação. Semelhantemente ao observado neste
402 experimento, a proporção molar de butirato no rúmen teve relacionamento positivo com
403 a proporção diária do consumo pela manhã.

404 CONCLUSÕES

405 A suplementação com CBL induziu maior aumento no CMS do que na produção
406 de leite, o que resultou na diminuição da eficiência alimentar, e teve efeitos sobre a
407 digestibilidade de nutrientes e a fermentação ruminal.

459 REFERÊNCIAS

- 460 ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy
461 cattle. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.1598-1624, 2000.
- 462 AOAC. Official Methods of Analysis. 19^a ed. Gaithersburg, MD: AOAC
463 INTERNATIONAL. 2012.
- 464 CANNON, S.J.; FAHEY JR, G.C.; MURPHY, M.R. et al. Inclusion of psyllium in milk
465 replacer for neonatal calves. Effects on growth, digesta viscosity, rate of passage, nutrient
466 digestibilities, and metabolites in blood. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.3652-3660, 2010.
- 467 CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle
468 based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of the technical details.
469 Aberdeen, UK: International Feed Resources Unit, Rowett Research Institute, p.1-21,
470 1992.

- 471 DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting
472 rumen protozoa. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p.182-185, 1984.
- 473 DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G. et al. Meta-analysis of the
474 influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk
475 production of ruminants. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.1620-1632, 2009.
- 476 FERREIRA, E.M.; PIRES, A.V.; SUSIN, I. et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty
477 acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil
478 blend. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v.216, p.30-39, 2016.
- 479 FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v.66, p.365-378, 1989.
- 480 HALL, M.B. Analysis of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: A
481 comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. *J.*
482 *Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.92, p.42-49, 2009.
- 483 HRISTOV, A.N.; IVAN, M.; RODE, L.M.; MCALLISTER, T.A. Fermentation
484 characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-
485 concentrate barley-based diets. *J. Animal Sci.*, v.79, p.515-524, 2001.
- 486 KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G.; GILLILAN, S.E. Bacterial direct-fed
487 microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Animal Sci.*,
488 v.81, p.E120-E132, 2003.
- 489 LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, J. A simple method for the
490 analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.922-928,
491 1996.
- 492 LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, Y. Rapid determination of yeast viability.
493 *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v.11, p.641-649, 1981.
- 494 MACKIE, R.I., GILCHRIST, F.M.C., ROBBERTS, A.M. et al. Microbiological and
495 chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high
496 concentrate diets. *J. Agric. Sci.*, v. 90, p. 241-254, 1978.
- 497 NATIONAL Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7^a ed.
498 Washington, DC: The National Academies Press, 2001. 381p.
- 499 NOCEK, J.E.; KAUTZ, W.P.; LEEDLE, J.A.Z.; ALLMAN, J.G. Ruminal
500 supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in
501 dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.429-433, 2002.
- 502 PEAKER, M. Recent advances in the study of monovalent ion movements across the
503 mammary epithelium: Relation to onset lactation. *J. Dairy. Sci.*, v.58, p.1042-1047, 1975.
- 504 POPPY, G.D.; RABIEE, A.R.; LEAN, I.J. et al. A meta-analysis of the effects of feeding
505 yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk
506 production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.6027-6041, 2012.

- 507 RAETH-KNIGHT, M.L.; LINN, J.G.; JUNG, H.G. Effect of Direct-Fed Microbials on
508 Performance, Diet Digestibility, and Rumen Characteristics of Holstein Dairy Cows. *J.*
509 *Dairy Sci.*, v.90, p.1802-1809, 2007.
- 510 SANTOS, W.P.; ÁVILA, C.L.S.; PEREIRA, M.N. et al. Effect of the inoculation of
511 sugarcane silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on feeding
512 behavior and milk yield of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, v.95, p.4613-4622, 2017.
- 513 STATISTICAL Analysis System. Version 9.3. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Cary, NC:
514 SAS Institute Inc, 2011.
- 515 SEO, J.K.; KIM, S.; KIM, M.H. et al. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-*
516 *Austr. J. Anim. Sci.*, v.23, p.1657-1667, 2010.
- 517 SOUZA, V.L.; LOPES, N.M.; ZACARONI, O.F. et al. Lactation performance and diet
518 digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores.
519 *Livest. Sci.*, v.200, p.35-39, 2017.
- 520 TIMMERMAN, H.M., KONING, C.J.M., MULDER, L., et al. Monostrain, multistrain
521 and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food*
522 *Microbiol.*, v.96, p.219-233, 2004.
- 523 VALLIMONT, J.E.; BARGO, F.; CASSIDY, T.W. et al. Effects of replacing dietary
524 starch with sucrose on ruminal fermentation and nitrogen metabolism in continuous
525 culture. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.4221-4229, 2004.
- 526 VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral
527 detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy*
528 *Sci.*, v.74, p.3583-3597, 1991.
- 529 VEIRA, D.M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.*,
530 v.63, p.1547-1560, 1986.
- 531 YOUSEF, M.K. (1^a ed) Stress physiology in livestock. Boca Raton: CRC Press Inc., 1985.
532 217p.

1 Suplementação de vacas leiteiras com bactérias e leveduras. II. Termorregulação e
2 imunidade
3 (Supplementation of dairy cows with bacteria and yeast. II. Thermoregulation and
4 immunity)

5
6 Letícia do Nascimento Resende¹, Rayana Brito da Silva², Ana Paula Peconick¹, Renata
7 Apocalypse Nogueira Pereira^{2,3}, Marcos Neves Pereira^{*1,2}

8
9 ¹Universidade Federal de Lavras, Lavras 37.200-000, MG

10 ²Better Nature Research Center, Ijaci 37.218-000, MG

11 ³Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Lavras 37.200-000, MG

12 *Email: mpereira@ufla.br
13

14 RESUMO - Avaliou-se a suplementação de vacas leiteiras com aditivo líquido contendo
15 bactérias lácticas, bactérias formadoras de esporos e leveduras (CBL). Vinte e seis vacas
16 Holandesas foram alimentadas individualmente com os tratamentos controle ou CBL (3,5
17 mL/kg de matéria seca) por 56 dias. O CBL aumentou as temperaturas retal e da pele e a
18 taxa de sudorese, mas não afetou a frequência respiratória. O tempo diário em decúbito
19 foi reduzido pelo CBL. A resposta imune à vacinação contra vírus/leptospirose no dia 36
20 (D0) foi avaliada. A interleucina (IL)-4 no soro tendeu a ser reduzida pelo CBL no D0 e
21 não diferiu nos dias 7 (D7) e 14 (D14) pós-vacinação. A IL-12 foi reduzida pelo CBL no
22 D7 e não diferiu no D0 e D14. Não houve diferença no interferon gamma e na IL-10. No
23 D0, CBL tendeu a aumentar monócitos como proporção dos leucócitos. A contagem de
24 células somáticas do leite (CCS) foi aumentada ($P = 0,03$) de 49.500 para 67.000
25 células/mL pelo CBL. O aumento na produção de leite e no consumo em resposta ao CBL
26 foi associado ao aumento na temperatura corporal e na sudorese, sem afetar a respiração,
27 alteração nos marcadores de imunidade e aumento na CCS de vacas com baixa CCS.

28 Palavras-chave: contagem de células somáticas, resposta imune, levedura, probiótico,
29 temperatura corporal

30 ABSTRACT - This experiment evaluated the supplementation of dairy cows with a liquid
31 additive containing lactic acid bacteria, spore-forming bacteria, and yeast (CBL). Twenty-

32 six Holstein cows were individually fed treatments control or CBL (3.5 mL/kg of dry
33 matter) for 56 days. The CBL increased rectal and skin temperatures and sweating, but
34 did not affect the respiratory frequency. Immune response to a virus/leptospirosis vaccine
35 on day 36 (D0) was evaluated. Serum interleukin (IL)-4 tended to be reduced by CBL on
36 D0 and did not differ on days 7 (D7) and 14 (D14) post-vaccination. The IL-12 was
37 reduced by CBL on D7 and did not differ on D0 and D14. Interferon gamma and IL-10
38 did not differ. On D0, CBL tended to increase monocytes as a proportion of leukocytes.
39 Milk somatic cell count (SCC) was increased ($P = 0.03$) from 49,500 to 67,000 cells/mL
40 by CBL. The increase in milk yield and intake in response to CBL was associated to
41 increased body temperature and sweating, with no effect on respiration, alteration in
42 immunity markers, and increased SCC of cows with low SCC

43 Keywords: body temperature, direct-fed microbial, immune response, probiotic, somatic
44 cell count

45 INTRODUÇÃO

46 Aditivos microbianos têm sido utilizados como alternativa aos antibióticos
47 promotores de desempenho, sendo coerentes à tendência naturalista dos consumidores de
48 produtos de origem animal. Microrganismos vivos (probióticos) ou inativos e seus
49 produtos metabólicos e meio de cultivo (prebióticos) são aditivos capazes de atuar como
50 promotores da digestão de nutrientes e controle de acidose ruminal em ruminantes
51 (Chaucheyras-Durand et al., 2008; Seo et al., 2010). O efeito positivo sobre o desempenho
52 de vacas leiteiras de aditivos microbianos à base de leveduras (Desnoyers et al., 2009;
53 Poppy et al., 2012) e/ou bactérias (Krehbiel et al., 2003; Souza et al., 2017) tem sido
54 demonstrado.

55 Recentemente foi observado que a suplementação com leveduras vivas e mortas
56 pode aumentar a síntese ruminal de niacina (Salvati et al., 2015; Dias et al., 2018), capaz
57 de ter efeito positivo sobre a circulação periférica e a perda evaporativa de calor
58 metabólico (Zimbelman et al., 2010). Por este mecanismo, leveduras podem induzir
59 ganho na eficiência alimentar (leite/consumo), por redução na exigência nutricional para
60 manutenção da homeotermia. Polissacarídeos da parede celular de leveduras também têm
61 potencial para atuar positivamente sobre a função imune de vacas leiteiras (Zaworski et
62 al., 2014), auxiliando no controle da mastite e da contagem de células somáticas (CCS)

63 do leite (Oliveira et al., 2010; Nocek et al., 2011; Zaworski et al., 2014, Yuan et al., 2015,
64 Silva, 2018), e podem ter ação adjuvante nas vacinações (Valdez et al., 2014). A
65 superfície do trato digestivo faz parte do sistema imune comum das mucosas que inclui
66 também o trato respiratório e as glândulas lacrimais, salivares e mamária,
67 consequentemente uma resposta imune iniciada por probióticos no tecido linfóide do trato
68 digestivo pode afetar a resposta imune em outras superfícies mucosas (Isolauri et al.,
69 2001). Probióticos bacterianos podem estimular os mecanismos endógenos de defesa de
70 animais, podendo amplificar a resposta imune humoral e estimular a resistência não
71 específica a patógenos microbianos (Perdigón et al., 1998), sendo o efeito dependente da
72 espécie e cepa do microrganismo.

73 Foi previamente relatado (Resende et al., 2019) que um produto comercial
74 contendo uma mistura de bactérias lácticas, bactérias formadoras de esporos e leveduras
75 cultivadas em consórcio aumentou o consumo de matéria seca (CMS) mais do que
76 aumentou a produção de leite, reduzindo a eficiência alimentar de vacas leiteiras, e teve
77 algum efeito sobre a fermentação ruminal e a digestibilidade de nutrientes. Neste artigo
78 será relatado o efeito do mesmo produto sobre a temperatura corporal e a imunidade.
79 Nossa hipótese foi a de que os microrganismos suplementados pela dieta atuariam
80 positivamente sobre a imunidade e reduziriam a temperatura corporal de vacas em
81 lactação.

82 MATERIAL E MÉTODOS

83 O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais
84 da Universidade Federal de Lavras (075/17). Detalhes metodológicos são relatados em
85 Resende et al. (2019). Resumidamente, 26 vacas Holandesas (185 ± 141 dias em lactação)
86 receberam uma dieta de padronização por 14 dias e foram blocadas por paridade e
87 produção de leite e alocadas a um tratamento por 56 dias: Controle (CTL) ou Consórcio
88 de Bactérias e Leveduras (CBL. 3,5 mL/kg de MS da dieta. Global Saúde, Pouso Alto,
89 Brasil/SCD Probiotics, Kansas City, EUA). De acordo com o fabricante, o produto
90 líquido era composto por *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Enterococcus lactis*,
91 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces*
92 *cerevisiae*, e outros microrganismos não relatados.

93 As vacas foram ordenhadas 3 \times /dia e foram alimentadas individualmente. Nos
94 últimos quatro dias do período de padronização, amostras de leite foram coletadas para

95 avaliação da contagem de células somáticas (CCS), que foi utilizada como covariável no
96 modelo estatístico. Amostras de leite também foram coletadas nos dias 6 e 7 de cada
97 semana experimental (1 a 8). As amostras foram armazenadas em frascos contendo 2-
98 bromo-2-nitropropano-1-3-diol e foram mantidas sob refrigeração por no máximo 2 dias
99 até serem enviados para um laboratório comercial (Laboratório Centralizado da
100 Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, APCBRH, Curitiba,
101 Brasil). A contagem de células somáticas foi feita por espectrometria de infravermelho
102 (Bentley Instruments Inc., Chaska, EUA). A CCS ($\times 1.000$ células/mL) foi transformada
103 em uma escala linear de 0 a 9 (CCS linear), sendo o ponto médio de cada escore linear
104 representado pelos seguintes valores de CCS: 12,5 para CCS linear 0; 25 para CCS linear
105 1; 50 para CCS linear 2; 100 para CCS linear 3; 200 para CCS linear 4; 400 para CCS
106 linear 5; 800 para CCS linear 6; 1600 para CCS linear 7; 3200 para CCS linear 8 e 6400
107 para CCS linear 9. A CCS linear foi calculada a partir do logaritmo natural da CCS
108 mensurada ($\times 1.000$ células/mL) e os valores médios de CCS de cada escore. $CCS\ linear = -3,6438 + 1,4427 \times \ln(SCC)$. Valores negativos foram arredondados para zero.

109
110 As temperaturas retal e da pele e a frequência respiratória foram mensuradas nos
111 dias 4 e 7 de cada semana experimental iniciando às 09:00, 15:30 e 22:00 h. Foram
112 utilizados termômetros digitais para registrar a temperatura retal (Omron. MC-245.
113 Dongbei. Dalian, China). A frequência respiratória (/min) foi determinada como a média
114 de três contagens consecutivas do movimento do flanco por 15 segundos e extrapolada
115 para 1 min. Uma área de 4×4 cm foi tricotomizada na região escapular um dia antes da
116 mensuração da temperatura da pele com um termômetro infravermelho (88E. HighMed.
117 São Paulo, Brasil). O tempo em decúbito de cada vaca foi registrado no dia 51 do período
118 experimental por observação visual em intervalos de 5 min por 24 h.

119 A sudorese foi avaliada no dia 7 de cada semana experimental às 16:00 h. A
120 técnica colorimétrica utilizou discos de papel corados com cloreto de cobalto (Schleger e
121 Turner, 1965). O papel de filtro (Whatman 1, $11 \mu m$ de porosidade) foi imerso numa
122 solução de cloreto de cobalto a 10% e depois foi seco em estufa a $100^{\circ}C$ por 12 h. Três
123 discos (0,5 cm de diâmetro) foram fixados em lâminas histológicas com fita adesiva
124 transparente. As lâminas com os discos foram imediatamente colocadas em um recipiente
125 com tampa contendo sílica. Uma área retangular de 3×10 cm foi tricotomizada um dia
126 antes da avaliação. As mensurações foram obtidas no flanco esquerdo (fossa paralombar),

127 20 cm abaixo do lombo. A fita com os discos foi fixada sobre a área de amostragem. O
128 tempo para cada disco mudar da cor azul para rosa claro foi cronometrado e o valor médio
129 foi utilizado para calcular a sudorese ($\text{g/m}^2/\text{h}$): $38.446,6/T$, onde T é tempo em segundos.

130 Amostras de sangue para análise de glicose foram obtidas nos vasos coccígeos 12
131 h após a alimentação da manhã no dia 6 de cada semana com tubos vacutainer contendo
132 EDTA e fluoreto de potássio. O plasma foi obtido por centrifugação a $1.800 \times g$ por 10
133 min e armazenado a -20°C até análise (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para
134 Laboratórios, Goiânia, Brasil).

135 Foi avaliada a resposta imune a um desafio vacinal contra rinotraqueíte infecciosa
136 bovina, diarreia viral bovina, parainfluenza tipo 3, vírus sincicial respiratório bovino e
137 leptospirose causada por *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L.*
138 *icterohaemorrhagiae* e *L. Pomona* (CattleMaster GOLD FP 5/L5. Zoetis Indústria de
139 Produtos Veterinários, Campinas, Brasil) no dia 36. Os animais eram rotineiramente
140 vacinados a cada 6 meses. Amostras de sangue foram obtidas dos vasos coccígeos para a
141 análise do hemograma completo antes da vacinação (Dia 0) e 7 dias após (Dia 7). As
142 amostras foram coletadas em tubos vacutainer contendo EDTA e encaminhadas para
143 análise em laboratório comercial (Laboratório Santa Cecília, Lavras, Brasil). As
144 concentrações de hemácias, hemoglobina, hematócrito, amplitude de distribuição dos
145 glóbulos vermelhos, plaquetas, leucócitos totais e a contagem diferencial de células foram
146 obtidas por um analisador automático (Modelo pocH-100iV Diff. Sysmex, Kobe, Japão).
147 As contagens foram confirmadas através de contagem microscópica de esfregaço em
148 lâmina. O volume corpuscular médio foi calculado como: $(\text{hematócrito}/\text{hemácias}) \times 10$.
149 Hemoglobina corpuscular média foi calculada como: $(\text{hemoglobina}/\text{hemácias}) \times 10$.
150 Concentração de hemoglobina corpuscular média foi calculada como:
151 $(\text{hemoglobina}/\text{hematócritos}) \times 100$.

152 Amostras de sangue foram obtidas para mensuração de citocinas séricas nos dias
153 0, 7 e 14 após a vacinação em tubos vacutainer sem anticoagulante. As amostras de soro
154 foram armazenadas a -20°C até análise. A concentração de citocinas séricas foi
155 mensurada utilizando kit ELISA para Interleucina (IL)-4 (Bovine IL-4; Cat. No. BI0014.
156 NeoBiolab, Neo Group Inc., Woburn, EUA), IL-12 (Bovine IL-12; Cat. No. BI0040.
157 NeoBiolab, Neo Group Inc., Woburn, EUA), interferon gamma (IFN- γ . Bovine IFN- γ ;
158 Cat. No. EB1000. FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, China) e IL-10 (Bovine

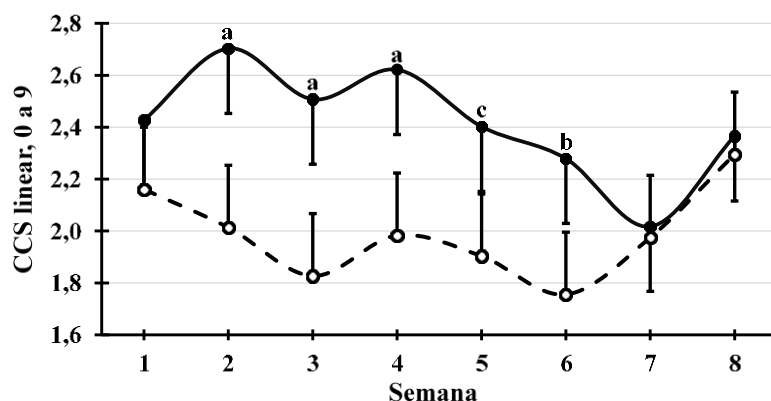
159 IL-10; Cat. No. EB0075. FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, China). A leitura
160 foi realizada por um espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, Waltham,
161 EUA) a um comprimento de onda de 450 nm.

162 Os dados obtidos ao longo do tempo foram analisados com o PROC MIXED do
163 SAS (Statistical..., 2011). A temperatura retal e a da pele e a frequência respiratória foram
164 analisadas com modelo estatístico contendo o efeito aleatório do bloco (1 a 13), os efeitos
165 fixos de tratamento (CTL ou CBL) e tempo (dias 1 a 16), e a interação entre tratamento e
166 tempo. O efeito de vaca aninhada em tratamento foi definido como medida de erro para
167 testar o efeito de tratamento. Para a análise da CCS linear ao longo do tempo foi acrescido
168 ao modelo anterior o efeito de covariável (medida da CCS linear no final do período de
169 padronização). Para cada variável, a melhor estrutura de covariância foi definida pelo
170 critério Bayesiano de Schwarz entre autoregressiva de primeira ordem e simetria
171 composta. As variáveis imunológicas foram analisadas por dia de amostragem com
172 modelo contendo o efeito aleatório de bloco (1 a 13) e o efeito fixo de tratamento (CTL
173 ou CBL). Os graus de liberdade foram calculados usando a opção Kenward-Roger. A
174 frequência de temperatura retal $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ foi analisada com o procedimento GENMOD
175 usando regressão logística para dados binomiais. A significância foi declarada a $P \leq 0,05$
176 e as tendências a $0,05 < P \leq 0,10$.

177

RESULTADOS

178 A CCS linear do leite está representada na Fig. 1. A CCS linear foi inferior a 3,0
179 durante todo o experimento, o equivalente a < 100.000 células/mL, denotando que as
180 vacas tinham baixa CCS. As vacas suplementadas com CBL tiveram um aumento ($P =$
181 $0,03$) de $17,500$ células/mL no equivalente da CCS linear comparado ao CTL. A resposta
182 em CCS foi rápida (semana 1), mas não foi observada nas semanas 7 e 8 do período
183 experimental.



184
 185 Figura 1. Contagem de células somáticas linear (CCS linear) nos tratamentos Controle (
 186 --○--) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (—●—). Média ± Erro padrão das médias:
 187 Controle (1,99 ± 0,148) e Consórcio de Bactérias e Leveduras (2,42 ± 0,156).
 188 Equivalência do escorre linear: 1,99 = 49.500 células/mL e 2,42 = 67.000 células/mL. P
 189 = 0,03 para efeito fixo de tratamento, $P < 0,01$ para efeito fixo de semana e $P = 0,71$ para
 190 interação entre tratamento e semana. Opção *Slice* do SAS: $^aP \leq 0,05$, $^bP = 0,10$ e $^cP =$
 191 0,13.

192 A temperatura retal e a da pele e a frequência respiratória estão na Tab. 1. O
 193 tratamento CBL aumentou ($P < 0,02$) a temperatura retal às 09:00 h (+ 0,2°C), 15:30 h e
 194 22:00 h (+ 0,3°C) e tendeu a aumentar a temperatura da pele às 09:00 h ($P = 0,10$) e
 195 aumentou ($P = 0,02$) às 22:00 h (+ 0,04°C). Não houve efeito de tratamento sobre a
 196 frequência respiratória.

197 Tabela 1. Temperaturas retal e da pele e frequência respiratória nos tratamentos Controle
 198 (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL)

	Tratamentos			P	
	CTL	CBL	EPM ¹	Tratamento	Tratamento × Dia
Retal, ² °C					
09:00 h	38,1	38,3	0,05	< 0,01	0,52
15:30 h	38,5	38,8	0,07	0,01	0,54
22:00 h	38,2	38,5	0,07	0,02	0,69
Pele, ² °C					
09:00 h	33,8	34,1	0,13	0,10	0,54
15:30 h	35,0	35,2	0,13	0,23	0,92
22:00 h	34,7	35,1	0,12	0,02	0,80
Frequência respiratória, ² /min					
09:00 h	48	51	2,2	0,34	0,71
15:30 h	57	58	2,8	0,74	0,96
22:00 h	54	54	2,3	0,86	0,65

199 ¹Erro padrão das médias

200 ² $P \leq 0,05$ para efeito fixo de dia (dia 4 e 7 de cada semana experimental = 16 mensurações)

201 A suplementação com CBL aumentou a proporção de vacas com temperatura retal
 202 (Tab. 2) acima de 39,2°C às 15:30 h ($P < 0,01$) e 22:00 h ($P = 0,02$), mas não afetou a
 203 proporção de vacas com alta temperatura retal pela manhã ($P = 0,95$). O limite de
 204 temperatura de 39,2°C foi utilizado como indicador de estresse térmico (Rhoads et al.,
 205 2009). As vacas suplementadas com CBL também tiveram menor ($P = 0,04$) tempo de

206 decúbito (Fig. 2) e maior ($P \leq 0,05$) sudorese nas semanas 4 e 5 do experimento (Fig. 3)
 207 do que as vacas no CTL. A concentração de glicose no plasma não diferiu ($P = 0,59$) nas
 208 8 semanas do experimento (Fig. 4).

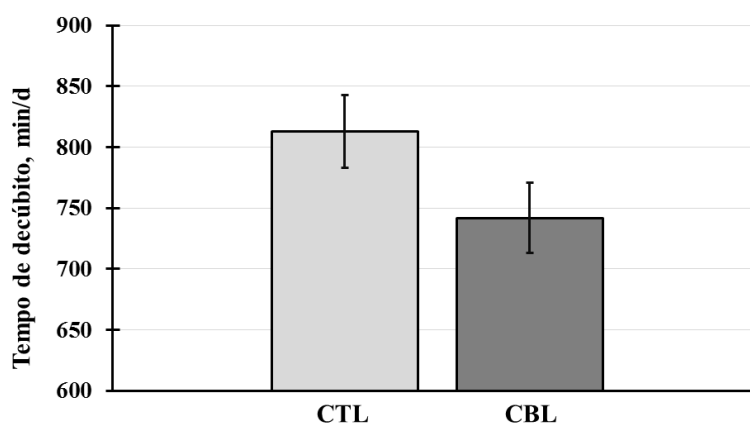
209 Tabela 2. Proporção de vacas com temperatura retal $\geq 39,2^\circ\text{C}$ às 09:00 h, 15:30 h e 22:00
 210 h nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL).
 211 Observações/tratamento: CTL = 208 e CBL = 192

	CTL	CBL	Est ¹	EP ²	RL	IC 95% ³		P
09:00 h	0,5	0,5	0,08	1,41	1,08	0,06	17,44	0,95
15:30 h	6,3	18,2	1,20	0,342	3,34	1,71	6,53	< 0,01
22:00 h	1,4	6,3	1,52	0,653	4,55	1,26	16,40	0,02

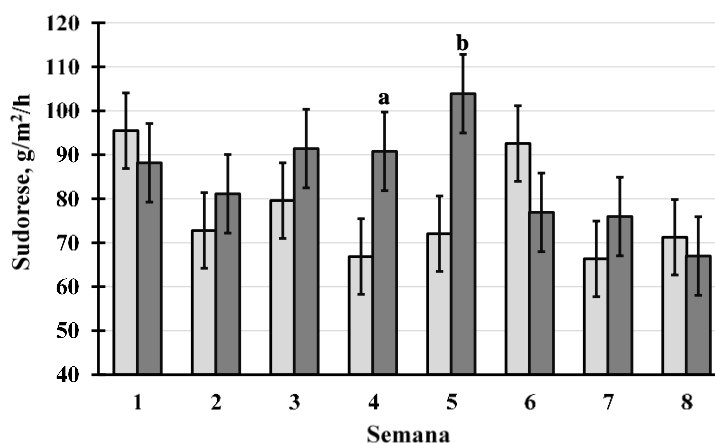
212 ¹Estimativa do parâmetro gerado com o procedimento GENMOD do SAS usando regressão logística para dados binomiais. CTL é
 213 zero

214 ²Erro padrão da estimativa

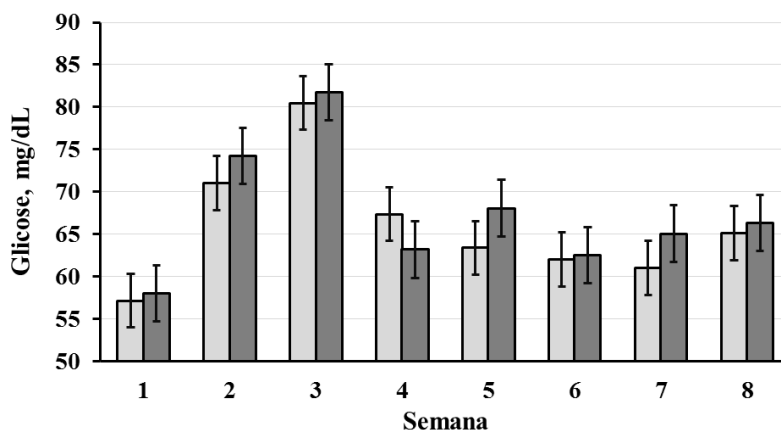
215 ³Intervalo de confiança de 95% para risco relativo



216
 217 Figura 2. Tempo de decúbito das vacas nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de
 218 Bactérias e Leveduras (CBL). $P = 0,04$ para efeito fixo de tratamento.



219
 220 Figura 3. Sudorese nos tratamentos Controle (□) ou Consórcio de Bactérias e Leveduras
 221 (■) às 16:00 h. Valor médio \pm EPM: Controle ($77,11 \pm 3,669$ g/m²/h) e Consórcio de
 222 Bactérias e Leveduras ($84,39 \pm 3,819$ g/m²/h). $P = 0,17$ para efeito fixo de tratamento; P
 223 $= 0,09$ para efeito fixo de semana e $P = 0,07$ para interação tratamento e semana. ^a $P =$
 224 $0,05$, ^b $P = 0,01$.



225
 226 Figura 4. Concentração de glicose no plasma nos tratamentos Controle (□) ou Consórcio
 227 de Bactérias e Leveduras (■). Média \pm Erro padrão da média: Controle ($65,8 \pm 1,81$
 228 mg/dL) e Consórcio de Bactérias e Leveduras ($67,4 \pm 1,89$ mg/dL). $P = 0,59$ para efeito
 229 fixo de tratamento, $P < 0,01$ para efeito fixo de semana e $P = 0,85$ para interação entre
 230 tratamento e semana.

231 Não houve efeito de tratamento ($P \geq 0,13$) sobre a concentração de hemácias,
 232 hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média,
 233 concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição dos glóbulos
 234 vermelhos (Tab. 3). O leucograma está descrito na Tab. 4. Monócitos como proporção
 235 dos leucócitos totais antes da vacina tendeu ser mais alto ($P = 0,10$) nas vacas do
 236 tratamento CBL.

237 Tabela 3. Concentração de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular
 238 médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média
 239 e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos antes da vacinação (Dia 0) e 7 dias
 240 pós-vacinação (Dia 7) nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias e
 241 Leveduras (CBL). Vacinação no dia 36 do período experimental

	CTL	CBL	EPM ¹	P
Hemácias, /mm ³				
Dia 0	6,1	6,3	0,15	0,27
Dia 7	6,1	6,4	0,16	0,21
Hemoglobina, g/dL				
Dia 0	9,4	9,7	0,25	0,33
Dia 7	9,3	9,7	0,27	0,26
Hematócrito, %				
Dia 0	27,2	28,5	0,63	0,16
Dia 7	26,8	28,4	0,72	0,13
Volume corpuscular médio, fL				
Dia 0	44,6	45,0	0,64	0,59
Dia 7	44,1	44,6	0,63	0,57
Hemoglobina corpuscular média, pg				
Dia 0	15,4	15,3	0,22	0,93
Dia 7	15,3	15,3	0,21	0,96
Concentração de hemoglobina corpuscular média, %				
Dia 0	34,5	34,1	0,34	0,35
Dia 7	34,7	34,3	0,31	0,35
Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos, %				
Dia 0	18,6	18,8	0,37	0,79
Dia 7	18,9	18,7	0,40	0,77

242 ¹Erro padrão das médias

243 Tabela 4. Concentração de plaquetas, leucócitos, linfócitos, monócitos e segmentados
 244 antes da vacinação (Dia 0) e 7 dias pós-vacinação (Dia 7) nos tratamentos Controle (CTL)
 245 Consórcio de Bactérias e Leveduras (CBL). Vacinação no dia 36 do período experimental

	CTL	CBL	EPM ¹	P
Plaquetas, 10 ³ /mm ³				
Dia 0	297,8	244,2	26,52	0,17
Dia 7	306,5	323,8	25,97	0,55
Leucócitos, 10 ³ /mm ³				
Dia 0	20,0	18,6	3,28	0,77
Dia 7	19,3	16,6	3,58	0,60
Linfócitos, 10 ³ /mm ³				
Dia 0	13,6	13,0	2,91	0,88
Dia 7	14,5	16,5	4,27	0,74
Linfócitos, % dos leucócitos				
Dia 0	63,9	66,3	3,67	0,65
Dia 7	68,3	68,9	4,24	0,92
Monócitos, 10 ³ /mm ³				
Dia 0	0,85	1,05	0,25	0,59
Dia 7	0,64	0,82	0,25	0,61
Monócitos, % dos leucócitos				
Dia 0	3,8	5,7	0,83	0,10
Dia 7	2,8	2,9	0,53	0,85
Segmentados, 10 ³ /mm ³				
Dia 0	5,2	4,2	0,59	0,19
Dia 7	3,8	5,4	1,29	0,40
Segmentados, % dos leucócitos				
Dia 0	30,9	25,8	3,59	0,33
Dia 7	25,9	24,7	3,97	0,82

246 ¹Erro padrão das médias

247 A concentração de citocinas séricas é relatada na Tab. 5. Houve tendência ($P =$
 248 0,10) de queda na IL-4 antes da vacinação e queda ($P = 0,02$) de IL-12 7 dias pós-
 249 vacinação nas vacas suplementadas com CBL. A IL-4 não diferiu ($P \geq 0,26$) nos dias 7 e
 250 14 pós-vacinação, nem a IL-12 nos dias 0 e 14 ($P \geq 0,27$). Não houve diferença ($P \geq 0,20$)
 251 no IFN- γ e na IL-10.

252 Tabela 5. Concentração de citocinas séricas antes da vacinação (Dia 0) e nos dias 7 (Dia
 253 7) e 14 (Dia 14) pós-vacinação nos tratamentos Controle (CTL) ou Consórcio de Bactérias
 254 e Leveduras (CBL). Vacinação no dia 36 do período experimental

	CTL	CBL	EPM ¹	P
Interleucina 4, pg/mL				
Dia 0	858,6	778,8	38,16	0,10
Dia 7	835,6	778,7	37,64	0,28
Dia 14	826,0	774,1	33,45	0,26
Interferon gamma, pg/mL				
Dia 0	873,7	781,7	84,91	0,43
Dia 7	703,9	697,7	65,90	0,95
Dia 14	560,8	576,7	45,19	0,81
Interleucina 10, pg/mL				
Dia 0	7,6	8,6	1,38	0,82
Dia 7	20,5	22,2	5,24	0,76
Dia 14	12,9	13,0	1,01	0,20
Interleucina 12, pg/mL				
Dia 0	670,5	628,0	36,16	0,27
Dia 7	709,1	611,2	47,37	0,02
Dia 14	764,9	746,7	42,92	0,74

255 ¹Erro padrão das médias

256

DISCUSSÃO

257 A suplementação com CBL aumentou a CCS do leite de 49.500 para 67.000
258 células/mL, ambos os teores ainda baixos e não indicativos de mastite subclínica
259 (Harmon, 1994). Variações na CCS dependem, principalmente, do recrutamento de
260 leucócitos do sangue para o tecido mamário e para o leite (Burvenich et al., 1994), que
261 ocorrem em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos
262 (PAMPs) que ocorre após os microrganismos atravessarem as barreiras externas e pode
263 desenvolver uma reação inflamatória como consequência da ativação do sistema imune
264 inato (Akira et al., 2006). O produto utilizado neste estudo, por ser composto por bactérias
265 e leveduras, é rico em PAMPs, o que justifica o aumento da CCS pela ativação da
266 imunidade inata e recrutamento de leucócitos. Contudo a resposta iniciada não
267 comprometeu os padrões de desempenho do rebanho. Tem sido sugerido que a CCS muito
268 baixa pode facilitar a infecção por patógenos na glândula mamária, aumentando a
269 suscetibilidade à mastite clínica (Schukken et al., 1989; Rainard et al., 2018). Neste
270 experimento, o aumento na CCS em resposta ao CBL parece refletir ganho na imunidade
271 da glândula mamária e foi associado a maior produção de leite e de lactose (Resende et
272 al., 2019).

273 Dentre os marcadores imunes avaliados, monócitos como proporção dos
274 leucócitos do sangue imediatamente antes da vacinação (dia 36 do experimento) tenderam
275 a ser maior nas vacas suplementadas com CBL do que no CTL. Os fagócitos
276 mononucleares estão entre as células mais importantes na resposta imunológica, sendo
277 importantes efetores do início ao final da resposta imune (Rainard e Riollet, 2006). Após
278 o desafio imune, o estímulo imunogênico presente na vacina nivelou o recrutamento de
279 todos os leucócitos. Silva (2018) observou que em vacas leiteiras a suplementação com
280 células vivas de 2 cepas de *S. cerevisiae* reduziu a CCS do leite de 384.000 células/mL
281 para 225.000 e 258.000 células/mL, associado a redução no teor de monócitos no sangue.
282 Estes dados sugerem haver um relacionamento positivo entre o teor de monócitos no
283 sangue e a CCS do leite.

284 Imediatamente antes da vacinação também houve tendência de menor
285 concentração sérica da citocina IL-4 nos animais suplementados com CBL. Como a IL-4
286 é uma citocina anti-inflamatória, é provável que a menor concentração tenha propiciado
287 o aumento da CCS detectado nas vacas que receberam CBL. Segundo Winkler et al.
288 (2007), citocinas do tipo Th2, como a IL-4, aumentam a imunidade humoral e ativam os

289 eosinófilos e os mastócitos e estão relacionadas com a produção de anticorpos IgE. A
290 concentração de IL-4 foi praticamente constante nos 3 dias de amostragem e não houve
291 efeito de tratamento nos dias 7 e 14 pós-vacinação. Estes dados sugerem que o CBL
292 tornou o perfil de resposta imune antes da vacinação menos Th2, mas não afetou esta
293 característica da resposta imune após a vacinação. Diferentemente do aqui observado, a
294 concentração de IL-4 no soro de vacas leiteiras aumentou abruptamente no dia 7 e se
295 manteve alta até o dia 15 pós-vacinação contra raiva (Silva, 2018), sugerindo que o perfil
296 da resposta imune à vacinação depende do tipo da vacina utilizada.

297 As vacas suplementadas com CBL foram aparentemente mais lentas no aumento
298 da IL-12 após a vacinação do que as vacas no CTL, já que tiveram menor concentração
299 sérica de IL-12 no dia 7 após a vacinação. Uma resposta mais lenta a um desafio vacinal
300 pode ser desejável para não afetar o desempenho do animal, uma vez que durante uma
301 resposta inflamatória exacerbada pode desencadear reações febris (Winkler et al., 2007).
302 A IL-12 foi mais baixa no dia 0 do que no dia 14, mas não houve diferença entre
303 tratamentos nestes dias de amostragem. Não houve efeito de tratamento sobre a
304 concentração sérica de IFN- γ em nenhum dos dias de amostragem. A secreção de
305 citocinas pró-inflamatórias, que caracteriza o tipo de resposta imune Th1, como a IL-12
306 e IFN- γ , pode induzir a produção de proteínas de fase aguda ou quimiocinas, provocar
307 reações febris e desencadear o recrutamento de células inflamatórias para os tecidos,
308 incluindo neutrófilos e monócitos (Winkler et al., 2007). O aumento na concentração de
309 IL-12 após a vacinação é coerente à ocorrência de perfil de resposta imune Th1, mas a
310 queda pós-vacinal no IFN- γ não suporta o estabelecimento deste perfil de resposta imune
311 à vacina. Era esperado que o IFN- γ tivesse o mesmo comportamento da IL-12. Segundo
312 Trinchieri (1997) a produção de IL-12 é seguida e é necessária para o início da produção
313 de IFN- γ , entretanto essa resposta não pôde ser observada até 21 dias após a vacinação.
314 Silva (2018) também não observou efeito da suplementação de vacas leiteiras com
315 leveduras sobre a concentração sérica de IFN- γ antes, 7 e 15 dias após vacinação anti-
316 rábica, mas a vacina também induziu queda na concentração sérica desta citocina.

317 A IL-10, outra citocina do perfil Th2 (Carrol e Forsberg, 2007), teve aumento
318 abrupto 7 dias após a vacinação e retornou a nível pouco acima do basal no dia 14 após a
319 vacinação, mas a concentração sérica não variou entre os tratamentos. Assume-se que as
320 produções de IL-10 e IL-12 são reguladas reciprocamente (Ma et al., 2015). Entretanto,

321 não houve relacionamento inverso entre as concentrações de IL-10 e IL-12, já que o
322 aumento abrupto de IL-10 no dia 7 pós-vacinação não foi acompanhado por queda de IL-
323 12 nos dias 7 ou 14.

324 A suplementação com CBL aumentou a temperatura corporal e reduziu o tempo
325 diário em decúbito, sugestivo de desconforto térmico (Allen et al., 2015). Entretanto, não
326 houve efeito do tratamento sobre a frequência respiratória e o aumento na temperatura
327 corporal foi associado a maior consumo de matéria seca e produção de leite (Resende et
328 al., 2019). A similaridade na gasometria venosa suporta a falta de efeito de tratamento
329 sobre a respiração (Collier et al., 1982). Estes sinais sugerem que apesar de ter ocorrido
330 aumento na temperatura do corpo no CBL, os animais não tiveram estresse calórico
331 acentuado. O aumento na sudorese nas semanas 4 e 5 do experimento pode ter decorrido
332 do efeito dos microrganismos suplementados sobre a função ruminal e a vasodilatação
333 periférica (Salvati et al. 2015; Dias et al., 2018). As semanas de aumento significativo na
334 sudorese também foram as semanas onde o CBL aumentou o leite e o consumo
335 relativamente ao CTL (Resende et al., 2019). Aumento na sudorese parece ter precedido
336 o aumento da frequência respiratória como mecanismo para aumentar a dissipação de
337 calor metabólico e foi aparentemente suficiente para manter a temperatura corporal dentro
338 de limites fisiológicos capazes de não penalizar o consumo e o desempenho leiteiro. Neste
339 caso, a perda evaporativa de calor por sudorese pode ter reduzido levemente a exigência
340 nutricional de manutenção para manutenção da homeotermia, disponibilizando mais glicose
341 para a síntese de lactose no leite, sem afetar o teor de glicose no sangue. O aumento na
342 produção de leite precedeu o aumento no consumo, sugerindo que o maior consumo foi
343 consequência da maior produção (Resende et al., 2019). O maior consumo e metabolismo
344 de nutrientes pode ter induzido o ganho em temperatura do corpo e foi associado a maior
345 desempenho leiteiro.

346 CONCLUSÕES

347 A suplementação de vacas leiteiras com bactérias e leveduras aumentou a
348 temperatura corporal e a sudorese, sem afetar a frequência respiratória, teve efeito sobre
349 alguns marcadores da resposta imune e aumentou a CCS do leite de vacas com baixa
350 CCS, sugerindo que houve ganho em imunidade da glândula mamária.

351 REFERÊNCIAS

352 SHIZUO AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate

- 353 Immunity. *Cell*, v.124, p.783-801, 2006.
- 354 ALLEN, J.D.; HALL, L.W.; COLLIER, R.J. Effect of core body temperature, time of
355 day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing
356 mild to moderate heat stress. *J. Dairy Sci.*, v. 98, p. 118-127, 2015.
- 357 BURVENICH, C.; PAAPE, M.J.; HILL, A.W. et al. Role of the neutrophil leucocyte in
358 the local and systemic reactions during experimentally induced *E.coli* mastitis in cows
359 immediately after calving. *Vet. Q.*, v.16, p.45-50, 1994.
- 360 CARROL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity.
361 *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.23, p.105-149, 2007.
- 362 CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N.D.; BACH, A. Effects of active dry
363 yeasts on the rumen microbial ecosystem: past , present and future. *Anim. Feed Sci. Tech.*,
364 v.145, p.5-26, 2008.
- 365 COLLIER, R.J.; BEEDE, D.K.; THATCHER, W.W. et al. Influences of environment
366 and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.*, v.65, p.2213-
367 2227, 1982.
- 368 DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G. et al. Meta-analysis of the
369 influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk
370 production of ruminants. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.1620-1632, 2009.
- 371 DIAS, J.D.L.; SILVA, R.B.; FERNANDES, T. et al. Yeast culture increased plasma
372 niacin concentration, evaporative heat loss, and feed efficiency of dairy cows in a hot
373 environment. *J. Dairy Sci.*, v.101, p.5924-5936, 2018.
- 374 ISOLAURI, E. et al. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*, v.73, p.444S-
375 450S, 2001.
- 376 KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G.; GILLILAN, S.E. Bacterial direct-fed
377 microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Animal Sci.*,
378 v.81, p.E120-E132, 2003.
- 379 MA, X.; YAN, W.; ZHENGET, H. al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and
380 function in macrophages and dendritic cells. *F1000 Research*, v. 4, p. 1–13, 2015.
- 381 NOCEK, J.E.; HOLT, M.G.; OPPY, J. Effects of supplementation with yeast culture and
382 enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J. Dairy
383 Sci.*, v.94, p.4046-4056, 2011.
- 384 OLIVEIRA, B.M.L.; BITENCOURT, L.L.; SILVA, J.R.M. et al. Suplementação de
385 vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,
386 v.62, p.1174-1182, 2010.
- 387 PERDIGÓN, G.; MACIAS M.E.; ALVAREZ, S. et al. Systemic augmentation of the
388 immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* e
389 *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*, v.63, p.17-23, 1998.

- 390 POPPY, G.D.; RABIEE, A.R.; LEAN, I.J. et al. A meta-analysis of the effects of feeding
391 yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk
392 production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.6027-6041, 2012.
- 393 RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; BOICHARD, D.; RUPP, R. Invited review: Low milk
394 somatic cell count and susceptibility to mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.101, p.6703-6714, 2018.
- 395 RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.*,
396 v.37, p.369-400, 2006.
- 397 RESENDE, L.N.; SILVA, R.B.; ÁVILA, C.L.S. et al. Suplementação de vacas leiteiras
398 com bactérias e leveduras. I. Desempenho leiteiro, consumo e digestão. *Arq. Bras. Med.*
399 *Vet. Zootec.*, v.71, p. , 2019.
- 400 RHOADS, M. L.; RHOADS, R.P.; VANBAALE M. J. et al. Effects of heat stress and
401 plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of
402 circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.1986-1997, 2009.
- 403 SALVATI, G.; MORAIS JUNIOR, N. N. M.; MELO, A. C. S. et al. Response of lactating
404 cows to live yeast supplementation during summer. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.4062-4073,
405 2015.
- 406 STATISTICAL Analysis System. Version 9.3. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Cary, NC:
407 SAS Institute Inc, 2011.
- 408 SCHLEGER, A.V.; TURNER, H.G. Sweating rates of cattle in the field and their reaction
409 to diurnal and seasonal changes. *Aust. J. Agric. Res.*, v.16, p.92-106, 1965.
- 410 SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F. et al. Monitoring udder health and
411 milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v.34, p.579-596, 2003.
- 412 SEO, J.K.; KIM, S.; KIM, M.H. et al. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-*
413 *Austr. J. Anim. Sci.*, v.23, p.1657-1667, 2010.
- 414 SILVA, K.T. *Effect of live yeast products on performance, digestion, thermoregulation,*
415 *and immune response of lactating cows during summer.* 2018. 90f. Tese (Doutorado em
416 Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 417 SOUZA, V.L.; LOPES, N.M.; ZACARONI, O.F. et al. Lactation performance and diet
418 digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores.
419 *Livest. Sci.*, v.200, p.35-39, 2017.
- 420 TRINCHIERI, G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during
421 intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr. Opin. Immunol.*, v.9, p.17-23, 1997.
- 422 VALDEZ, Y.; BROWN, E.M.; FINLAY, B.B. Influence of the microbiota on vaccine
423 effectiveness. *Trends Immunol.*, v. 35, p.526-537, 2014.
- 424 WINKLER, P.; GHADIMI, D.; KRAEHENBUHL, J. Molecular and cellular basis of

- 425 microflora-host interactions. *J Nutr*, v.137, p.756S-772S, 2007.
- 426 YUAN, K.; MENDONÇA, L.G.D.; HULBERT, L.E. et al. Yeast product
427 supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory
428 signals in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.1–11, 2015.
- 429 ZAWORSKI, E.M.; FADDEN, N.A.; SANCHEZ, W.K. et al. Effects of feeding various
430 dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. *J.*
431 *Dairy Sci.*, v.97, p.3081-3098, 2014.
- 432 ZIMBELMAN, R.B.; BAUMGARD, L.H.; COLLIER, R.J. Effects of encapsulated
433 niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed
434 lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.2387-2394, 2010.

