



LUIZ MARCOS SIMÕES FILHO

**EFFECT OF GLUCAN PREBIOTICS ON GROWTH,
MILK REPLACER INTAKE, HEALTH AND IMMUNITY
OF DAIRY CALVES**

LAVRAS – MG

2022

LUIZ MARCOS SIMÕES FILHO

**EFFECT OF GLUCAN PREBIOTICS ON GROWTH, MILK REPLACER
INTAKE, HEALTH AND IMMUNITY OF DAIRY CALVES**

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

Dr. Alessandro de Sá Guimarães
Orientador
Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles
Coorientadora
Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

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

Simões Filho, Luiz Marcos.

Effect of glucan prebiotics on growth, milk replacer intake,
health and immunity of dairy calves / Luiz Marcos Simões Filho. -
2022.

88 p. : il.

Orientador(a): Alessandro de Sá Guimarães.

Coorientador(a): Elaine Maria Seles Dorneles, Marcos Neves
Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Bezerros. 2. Gado de Leite. 3. Glucanos. I. Guimarães,
Alessandro de Sá. II. Dorneles, Elaine Maria Seles. III. Pereira,
Marcos Neves. IV. Título.

LUIZ MARCOS SIMÕES FILHO

**EFFECT OF GLUCAN PREBIOTICS ON GROWTH, MILK REPLACER
INTAKE, HEALT AND IMMUNITY OF DAIRY CALVES**

**EFEITO DOS PREBIÓTICOS À BASE DE GLUCANOS NO CRESCIMENTO,
CONSUMO DE SUCEDÂNEO LÁCTEO, SAÚDE E IMUNIDADE DE
BEZERRAS LEITEIRAS**

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

\

APROVADA em 28 de Janeiro de 2022

Dr. Alessandro de Sá Guimarães
Orientador

Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles
Coorientadora

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Coorientador

**LAVRAS - MG
2022**

DEDICATÓRIA

À minha esposa e filhos amados.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em especial, e em primeiro lugar, a Deus, por me proporcionar saúde e resiliência para manter o foco e chegar ao objetivo final;

À minha tão amada e imerecida família (esposa linda e filhos queridos), que Deus, em sua infinita magnanimidade, me proporcionou de forma tão maravilhosa;

Aos meus pais pelas orações, apoio, compreensão, amor e carinho em cada momento, os bons e os maus, de minha vida;

E, finalmente, aos meus orientadores, Alessandro, Marcos e Elaine, por terem me disponibilizado tanto conhecimento e proporcionado tanto aprendizado.

Tudo neste mundo se desfaz em pó, inclusive os valores humanos mais nobres e sublimes, e só o amor permanece, pois o amor é Deus, e aquilo que Deus amou por uma fração de segundo Ele jamais cessará de amar. (Olavo de Carvalho)

RESUMO

Os prebióticos de parede celular de fungos podem afetar a imunidade, o desempenho e a resposta de bezerras leiteiras a fatores estressantes, como descorna e desmame. Nosso objetivo foi avaliar o efeito de dois blends de prebióticos de parede celular de fungos em bezerras Holandesas lactentes submetidas à descorna e ao desmame. O experimento foi conduzido em um rebanho comercial (São Pedro / SP) de janeiro a março de 2020. Quarenta e cinco bezerras formaram 15 blocos por sequência de nascimento e receberam tratamento até o desmame. Os tratamentos foram: Controle (CTL) ou prebióticos 1 (PRE1) ou 2 (PRE2). As dosagens de 2 a 30 dias, 31 a 60 dias e 61 a 75 dias foram, respectivamente: 3, 6 e 9 g / d de PRE1 e 5, 10 e 15 g / d de PRE2. O substituto do leite (120 mL) com ou sem tratamentos foi administrado por via oral a cada bezerra diariamente. As bezerras foram alojadas individualmente e alimentadas até $17,9 \pm 2,2$ dias; e, depois foram alimentadas em grupo com um alimentador automático de leite. A ingestão de sucedâneo do leite, avaliação da temperatura retal às 07:00 h, doenças e medicamentos utilizados em tratamentos foram registrados diariamente. O peso corporal (PC) foi medido ao nascimento, descorna e desmame. A descorna foi aos $34,9 \pm 3,2$ dias e o desmame aos $75,1 \pm 2,21$ dias. Amostras de soro sanguíneo foram obtidas nos dias -1, +1, +3 e +7 em relação aos agentes estressores. A significância foi declarada em $P \leq 0,05$ e as tendências em $P \leq 0,10$. Não houve mortalidade de bezerras durante o experimento, mas 100% das bezerras em um tratamento tiveram pelo menos um evento de temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ (febre), mais de 50% tiveram diarreia e mais de 30% tiveram pneumonia. A análise de sobrevivência sugeriu que não houve efeito do tratamento no primeiro episódio de doenças. O PRE1 aumentou a temperatura retal média de 2 a 30 dias de vida ($39,0$ vs $38,9^{\circ}\text{C}$) e aumentou a frequência de dias com febre ($11,1$ vs $7,0\%$) em relação ao CTL e PRE2. Os prebióticos não afetaram a frequência das doenças nem o custo financeiro do tratamento das doenças. Do nascimento à descorna, houve tendência para o PRE1 reduzir o ganho de peso corporal em relação ao PRE2 (407 vs 499 g / d). Não houve efeito dos tratamentos sobre o ganho de peso corporal (529 g / d) e a ingestão de sucedâneo do leite ($6,7$ L / d) desde o nascimento até o desmame. Não houve efeito dos tratamentos em TNF- α e IL-6 próximo à descorna e desmame. Por volta da descorna, não houve efeito dos tratamentos sobre a haptoglobina. No dia -1 em relação à descorna, a IL-1 β foi maior no PRE1 do que no PRE2 e houve uma tendência para o PRE1 ser maior do que no CTL. O PRE1 também tendeu a aumentar IL-1 β em relação ao PRE2 no dia +7 após a descorna e o PRE1 tendeu a aumentar a IL-4 no dia +7 em relação ao PRE2. Nos dias +1 e +3 após o desmame, o PRE2 tendeu a reduzir a haptoglobina em relação ao PRE1. Houve tendências para a IL-1 β sérica no dia +1 após o desmame ser menor no CTL e PRE2 do que no PRE1 e, nesse mesmo dia, houve uma tendência para o PRE1 aumentar a IL-4 em relação ao PRE2. O aumento de IL-4 e IL-1 β em resposta a PRE1 sugere que PRE2 foi menos inflamatório do que PRE1. Nesse cenário de manejo de bezerras, os prebióticos de levedura não afetaram a incidência de febre, diarreia e pneumonia, custos de tratamento de doenças, ganho de peso corporal e ingestão de substituto do leite.

Palavras chaves: bezerros, gado de leite, glucanos, haptoglobina, imunidade, parede celular de leveduras

ABSTRACT

Fungi cell wall prebiotics may affect immunity, performance, and the response of dairy calves to stressors, such as dehorning and weaning. Our objective was to evaluate the effect of two prebiotic blends from fungi cell wall on nursing Holstein female calves subjected to dehorning and weaning. The experiment was conducted in a commercial herd (São Pedro/SP) from January to March, 2020. Forty-five calves formed 15 blocks by birth sequence and received a treatment until weaning. Treatments were: Control (CTL) or prebiotics 1 (PRE1) or 2 (PRE2). Dosages from 2 to 30 days, 31 to 60 days, and 61 to 75 days were, respectively: 3, 6, and 9 g/d of PRE1 and 5, 10, and 15 g/d of PRE2. Milk replacer (120 mL) with or without treatments was orally dosed to each calf daily. Calves were individually housed and fed until 17.9 ± 2.2 days and then were group fed with an automatic milk feeder. The intake of milk replacer, rectal temperature at 0700 h, diseases, and treatment drugs were recorded daily. Body weight (BW) was measured at birth, dehorning, and weaning. Dehorning was at 34.9 ± 3.2 days and weaning at 75.1 ± 2.21 days. Blood serum samples were obtained on days -1, +1, +3, and +7 relative to the stressors. Significance was declared at $P \leq 0.05$ and trends at $P \leq 0.10$. There was no calf mortality during the experiment, but 100% of calves in a treatment had at least one event of rectal temperature $\geq 39.5^\circ\text{C}$ (fever), more than 50% had diarrhea, and more than 30% had pneumonia. Survival analysis suggested that there was not a treatment effect on the first episode of diseases. The PRE1 increased the mean rectal temperature from 2 to 30 days (39.0 vs 38.9°C) and increased the frequency of days with fever (11.1 vs 7.0%) relative to CTL and PRE2. Prebiotics did not affect the frequency of diseases neither disease treatment cost. From birth to dehorning, there were trend for PRE1 to reduce BW gain relative to PRE2 (407 vs 499 g/d). There was no treatment effect on BW gain (529 g/d) and milk replacer intake (6.7 L/d) from birth to weaning. There was no treatment effect on blood TNF- α and IL-6 around dehorning and weaning. Around dehorning, there was no treatment effect on haptoglobin. On day -1 relative to dehorning, the IL-1 β was higher on PRE1 than PRE2 and there was a trend for PRE1 to be higher than CTL. The PRE1 also tended to increase IL-1 β relative to PRE2 on day +7 after dehorning and PRE1 tended to increase IL-4 on day +7 relative to PRE2. On days +1 and +3 after weaning, PRE2 tended to reduce haptoglobin relative to PRE1. There were trends for serum IL-1 β on day +1 after weaning to be lower on CTL and PRE2 than on PRE1 and on this same day there was a trend for PRE1 to increase IL-4 relative to PRE2. The increase in IL-4 and IL-1 β in response to PRE1 suggests that PRE2 was less inflammatory than PRE1. Under this calf management scenario, yeast prebiotics did not affect the incidence of fever, diarrhea, and pneumonia, disease treatment costs, BW gain, and milk replacer intake.

Key words: calves, dairy cattle, glucans, haptoglobin, immunity, yeast cell wall

SUMMARY

FIRST SECTION	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. HIPÓTESE.....	14
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4.1. Probióticos e prebióticos.....	14
4.2. Leveduras na nutrição de bezerros.....	15
4.3. β -glucanos na nutrição de bezerros.....	22
4.4. Imunologia básica em bezerros.....	29
4.4.1. Estresse e sistema imunológico.....	31
4.4.2. Citocinas.....	33
4.4.2.1. Interleucina 1 (IL-1).....	34
4.4.2.2. Interleucina 4 (IL-4).....	34
4.4.2.3. Interleucina 6 (IL-6).....	35
4.4.2.4. Fator de necrose tumoral (TNF α).....	35
4.4.3. Proteínas de fase aguda.....	36
4.5. Colostragem.....	37
4.6. Consumo de leite/sucedâneo lácteo, ganho de peso e eficiência alimentar.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
SECOND SECTION - ARTICLE.....	58

FIRST SECTION

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o potencial aparecimento e desenvolvimento de cepas de microrganismos resistentes a antibióticos tem provocado discussões em toda a classe médica e/ou ligada à saúde pública em todo o mundo. A pergunta a ser respondida é se o eventual *pool* de genes resistentes gerados pelo uso de antimicrobianos na produção animal impacta ou não a ocorrência das falhas terapêuticas em pacientes humanos. Justificado ou não, fato é que alternativas aos antibióticos devem ser investigadas (GUSTAFSON; BOWEN, 1997), tais como uso de prebióticos e probióticos na nutrição animal. Langford et al. (2003) relatam, como exemplo, que a adição de penicilina em doses sub-terapêuticas ao leite de bezerras leiteiras promoveu aumento significativo na resistência a antibióticos nas bactérias intestinais.

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse biotecnológico e comercial em componentes da parede celular de fungos, tais como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), incluindo seu uso como modificadores de resposta biológica, agentes anticâncer, bioadsorventes, ingredientes em processamento de alimentos e formulações cosméticas, e como sistemas para imobilizar vacinas orais, anticorpos e enzimas de importância industrial (FLEET, 1999). Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou bipartição, são normalmente aeróbios, mas podem sobreviver na ausência de oxigênio. A integridade da parede celular de *S. cerevisiae* é necessária para a viabilidade celular em várias condições ambientais (ORLEAN, 1997; ESTREM; SKATRUD, 2001). A parede celular compreende 15 - 30% do peso seco da célula com os componentes principais sendo β (1,3) glucana, β (1,6) glucana, manoproteínas e quitina.

A adoção universal da parede celular de fungos, como leveduras, e seus componentes individuais, mananoglicosacarídeos e β -glucana, como ingredientes funcionais na alimentação animal tem sido amplamente observada (MORAN, 2004). Os β -glucanos são geralmente descritos como polímeros de glicose e formam o principal polímero estrutural da parede celular das leveduras, e abrangem toda a célula com uma rede microfibrilar (KOLLAR et al., 1997; LIPKE; OVALLE, 1998). Métodos comuns para extrair β -glucanos incluem extração com água quente, extração com álcali (KAO et al., 2012), extração com enzima (PARK et al., 2014), extração ácida (PARK et al., 2001) e outros métodos de extração assistidos (ultrassom, microondas) (CHEN et al., 2017; HEMATIAN et al., 2017).

Os β (1,3) glucanos de alguns tipos de fungos pertencem a uma classe de drogas conhecidas como "modificadores da resposta biológica" (MRB's), que modificam a resposta biológica do hospedeiro pela estimulação do sistema imunológico (SANDULA et al., 1995). Ao estimular os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o desafio da doença, em vez de atacar o agente infeccioso ou causador do tumor, o β (1,3) glucano permanece atóxico para as células do organismo hospedeiro. Frequentemente, esse não é o caso com a terapêutica sintética ou semissintética.

As principais atividades imunofarmacológicas do β -glucano incluem o aumento da resistência do hospedeiro a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias, efeito antitumoral e prevenção da carcinogênese, radioprotetividade e efeito adjuvante (DILUZIO, 1983; BOHN; BEMILLER, 1995). A ação protetora de β (1,3) glucanos foi descrita como imunomodulação não específica devido ao envolvimento de uma série de diferentes vias imunológicas, incluindo ativação de macrófagos, estimulação de células T, estimulação do sistema retículo-endotelial (RES), ativação de células *natural-killer* (NK), ativação das vias clássicas e alternativas do complemento e aumento da produção de anticorpos. Os macrófagos são o alvo mais bem caracterizado para os β (1,3) glucanos (CZOP, 1986). A ativação de macrófagos com glucanas aumenta seu tamanho e número, estimula a secreção de lisozima e de citocinas e aumenta a fagocitose de antígenos (Meira et al., 1996). A ativação de macrófagos é mediada por meio do receptor 2 do tipo toll (TLR2) (UNDERHILL et al., 1999; PIVARCSI et al., 2003).

De acordo com Deng et al. (2016), β -glucanos ativam macrófagos através da via de sinalização TLR4/NF- κ B e promovem a regulação da produção de NO, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e expressão do mRNA de iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Além disso, como imunomoduladores, β -glucanos têm a capacidade de ativar células dendríticas, desencadeando várias vias de sinalização, incluindo a regulação positiva de marcadores de maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-12 e citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Receptores que reconhecem β -glucanos incluem dectina-1, CR3, TLR2 e TLR4, receptores necrófagos e lactosilceramida (LacCer) (KIRON et al., 2016). Dectina-1 é o principal receptor para β -glucanos em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (FULLER et al., 2012; MINATO et al., 2016; WU et al., 2016).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de dois *blends* comerciais de prebióticos ricos em extratos de β -glucanos oriundos de parede celular fúngica (PRE1 e PRE2) sobre o crescimento, o consumo de sucedâneo lácteo, a saúde e marcadores de resposta imune em bezerras Holandesas lactentes submetidas aos eventos estressantes descorna e desmama.

3. HIPÓTESE

A suplementação nutricional de bezerras leiteiras durante a fase de aleitamento com β -glucanos purificados aumenta o ganho de peso, o consumo de leite e a imunidade e reduz a incidência de doenças.

4. REVISÃO DE LITRATURA

4.1. Probióticos e prebióticos

Saad (2006) afirma que a nutrição otimizada é um novo conceito que tem sido dirigida, nas diversas espécies, no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também mitigar o risco de desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Nesse contexto, os alimentos funcionais e, especialmente os probióticos e prebióticos são conceitos novos e estimulantes (ROBERFROID, 2002).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003). A influência benéfica dos probióticos inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas em detrimento à proliferação das potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002).

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2001). Os prebióticos identificados

são carboidratos não-digeríveis e diversos oligossacarídeos que fornecem carboidratos que as bactérias benéficas do cólon são capazes de fermentar.

Grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos e os prebióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto a específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento na atividade das células *natural killer* (NK) e/ou por um aumento nos níveis de imunoglobulinas (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

O uso de probióticos é estratégia amplamente utilizada, com reconhecidos efeitos na colonização de bactérias protetivas que competem com bactérias patogênicas no trato gastrointestinal, e no desenvolvimento da resposta imune dos animais. Frizzo et al. (2011) realizaram estudo de meta-análise com vistas a entender os efeitos do uso de probióticos em bezerros no ganho de peso e na eficiência alimentar. Os autores avaliaram um total de 36 experimentos, sendo 1.547 bezerros, obtendo como resultado geral que animais que receberam probióticos aumentaram ganho de peso diário significativamente em comparação aos que não receberam probióticos (0,2 kg/d a mais de ganho). A meta-análise mostrou também que bezerros alimentados com probióticos melhoraram eficiência alimentar em relação aos bezerros que não receberam probióticos (0,814 kg a menos de consumo de alimento para cada kg de ganho de peso).

4.2. Leveduras (fungos unicelulares) na nutrição de bezerros

Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou bipartição. São normalmente aeróbias, mas podem sobreviver na ausência de oxigênio (LUND, 1974). A levedura mais comumente utilizada como aditivo na alimentação animal é a *S. cerevisiae* (LINN; RAETH-KNIGHT, 2005).

Um dos tipos de aditivos à base de leveduras para alimentação de ruminantes é a cultura de leveduras. Este aditivo contém células mortas de leveduras e o meio de crescimento no qual foram cultivadas, além de compostos oriundos de sua atividade metabólica, que podem agir como fatores de crescimento para bactérias e protozoários ruminais (POPPY et al., 2012). Substâncias presentes na cultura de leveduras, tais como ácidos orgânicos, vitaminas e aminoácidos, estimulariam o crescimento de populações específicas de bactérias no rúmen, como as utilizadoras de lactato e degradadoras de celulose (CALLAWAY; MARTIN, 1997), e induziriam ganho na digestibilidade de

nutrientes. Cultura de leveduras pode ainda estimular o crescimento microbiano ruminal, com aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno (HRISTOV et al., 2010).

Produtos para ruminantes contendo leveduras vivas podem melhorar a digestibilidade da fibra. Um dos modos de ação propostos para leveduras vivas no rúmen é o consumo de oxigênio no ambiente ruminal, pela própria atividade metabólica das células. A menor concentração de oxigênio no fluido ruminal criaria condições mais favoráveis para atividade de colonização e digestão de partículas de alimento pela microbiota celulolítica (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008). Outro mecanismo de ação de leveduras vivas seria a modulação do pH do fluido ruminal por diminuição da concentração de lactato, como consequência do estímulo a bactérias consumidoras de lactato (PINLOCHE et al., 2013). O pH ruminal mais alto e estável favoreceria a população de microrganismos degradadores de fibra, com aumento da digestibilidade ruminal desse nutriente.

Células vivas de levedura podem sobreviver à degradação ruminal e à digestão ácida no abomaso e chegar ao intestino delgado (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 1998). No intestino, glucanas e mananas da parede celular das leveduras estimulam a imunidade epitelial inespecífica (MORAN, 2004).

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). Suínos submetidos ao calor tiveram aumento da expressão de genes codificadores de proteína de resistência ao choque térmico (HSP70), com comprometimento da integridade da parede intestinal (PEARCE et al., 2013). Cultura de levedura diminuiu a expressão de genes de proteína de resistência ao choque térmico (HSP70) em células circulantes de vacas em lactação sob estresse por calor (LIU et al., 2014). Tais resultados indicam possível relação entre efeitos negativos do estresse por calor sobre o sistema imune e potencial atenuação desses efeitos por ação de aditivos à base de leveduras.

Cultura de levedura pode ter efeito benéfico na saúde e produção de animais em situação de estresse, como no período peri-parto (ZAWORSKI et al., 2014). O fornecimento de 56 ou 112 g/d de cultura de levedura (Diamond V Original XP; Mills, Inc.) por 28 dias antes e depois do parto baixou o teor plasmático de cortisol de vacas multíparas ($P = 0,02$) nos três primeiros dias após o parto. A cultura de leveduras aumentou a concentração plasmática de proteínas de fase aguda na primeira semana

após o parto, o que indica aumento da resposta imune inespecífica. Levedura enzimaticamente hidrolisada (YC-EHY) melhorou a saúde da glândula mamária de vacas em período de transição, evidenciada pela menor contagem de células somáticas (YUAN et al., 2015). As vacas receberam 0, 30, 60 ou 90 g/d de YC-EHY durante 21 dias pré-parto e 42 dias pós-parto. Houve efeito quadrático da dose de YC-EHY sobre o escore linear de células somáticas, com queda significativa na dose de 60 g/d na quinta semana de lactação. A concentração plasmática de anticorpos aumentou linearmente com a dose de YC-EHY, após desafio com ovoalbumina ($P = 0,06$). Os autores concluíram que YC-EHY foi capaz de modular a resposta imune. Os mecanismos de ação propostos para aditivos à base de leveduras vão além da digestão ruminal, como estimulação da imunidade de mucosas.

Magalhães et al. (2008) testaram os efeitos da suplementação com cultura de leveduras *S. cerevisiae* na performance, saúde e imunocompetência de bezerras holandesas nos primeiros 70 dias de vida. Quinhentas bezerras foram aleatoriamente alocadas em tratamentos com as culturas de leveduras (YC) ou no grupo controle. A cultura de leveduras foi adicionada na proporção de 2% da matéria seca à ração oferecida (mistura de grãos). O consumo de matéria seca da ração foi mensurado 5x por semana. O peso corporal foi medido nos dias 5, 30 e 68 de idade, o escore de reatividade (de 1 a 4, sendo 1 alerta e responsiva e 4 sem reação) foi mensurado diariamente e também escore de consistência fecal (de 1 a 4, sendo 1 firme e 4 muito aquosa). Também foram registradas a incidência e duração das desordens sanitárias, bem como os respectivos tratamentos. A temperatura retal foi medida sempre que um animal apresentou algum sinal clínico de doença (bezerras foram consideradas em febre quando temperatura retal superou 39,5°C) e o número de episódios de febre, diarreia e pneumonia foram registrados. Medicamentos usados nos tratamentos foram registrados, bem como seus custos. Foram avaliadas também algumas respostas dos sistemas imunológicos inato e humoral, em laboratório, tais como capacidade fagocitária de neutrófilos e produção de anticorpos. Não houve diferença entre tratamentos nas titulações séricas de anticorpos. O número de bactérias fagocitadas por neutrófilos tendeu a ser maior para YC ($P < 0,10$). Bezerras no grupo YC tenderam a ter menor escore de consistência fecal e menor incidência de febre e de diarreia ($P < 0,08$), mas não houve diferença nas doenças respiratórias. Houve tendência de menor número de casos de febre em bezerras alimentadas com a cultura de leveduras ($P = 0,10$). O uso de cultura de leveduras reduziu número médio de casos de diarreia por bezerra ($P = 0,02$) e

o número médio de casos de problemas sanitários por bezerra ($P < 0,02$). Em função da menor incidência de problemas sanitários, a proporção de bezerras tratadas com anti-inflamatórios e antidiarreicos foi reduzida no grupo que recebeu YC ($P < 0,04$), com tendência de menor uso de antibióticos nesse grupo ($P < 0,06$). A proporção de bezerras que morreram durante o experimento foi menor para o grupo de bezerras alimentadas com cultura de leveduras ($P = 0,05$). O ganho médio de peso diário foi 229 ± 11 g para bezerras em tratamento controle e 212 ± 11 g para bezerras que receberam YC, sem diferença estatística nos primeiros 30 dias de vida. O ganho médio de peso diário foi 780 ± 16 g para bezerras em tratamento controle e 772 ± 16 g para bezerras em YC, sem diferença estatística no período de 30 a 68 dias de vida. Os autores indicaram que a cultura de leveduras na ração das bezerras não aumentou consumo de matéria seca e não melhorou ganho médio de peso diário.

Lesmeister et al. (2004) observaram que a adição de 1% de cultura de leveduras à matéria seca da dieta de bezerros não afetou o crescimento, mas quando a inclusão chega a 2%, a cultura de leveduras pode afetar positivamente a ingestão de matéria seca, ganho médio de peso diário e eficiência alimentar quando comparado com dietas sem cultura de leveduras. Setenta e cinco bezerros, sendo 38 machos e 37 fêmeas da raça holandesa foram aleatoriamente alocados em três tratamentos, sendo 0% de cultura de leveduras na ração (Controle), 1% de cultura de leveduras na ração (1YC) e 2% de cultura de leveduras na ração (2YC). A ração, do tipo texturizada, foi oferecida *ad-libitum* por 42 dias. Desmame abrupto foi realizado aos 35 dias de idade e os animais foram mantidos no experimento por mais uma semana. Consumo de matéria seca de sucedâneo lácteo e de ração foram mensurados diariamente, bem como o escore de condição fecal. Animais foram pesados semanalmente e valores de ganho de peso médio diário, consumo de matéria seca e eficiência alimentar (consumo \div ganho) foram medidos para o período pré-desmama, pós-desmama e também para o período integral (42 dias). Pesos corporais iniciais ($42,24$, $42,70$ e $43,78 \pm 1,02$ kg; Controle, 1YC e 2YC, respectivamente), bem como consumo de matéria seca de sucedâneo lácteo (528 , 535 e 547 ± 13 g/d; Controle, 1YC e 2YC, respectivamente) não foram significativamente diferentes entre os tratamentos. Consumo de matéria seca de ração na semana pós-desmama foi significativamente maior em 2YC em relação ao grupo Controle (1.538 vs. 1.334 ± 61 g/d; $P < 0,02$) e também o foi na avaliação do período integral (555 vs. 479 ± 22 g/d; $P < 0,01$). Consumo total de matéria seca (sucedâneo lácteo + ração) para animais em 2YC foi significativamente maior no período pré-

desmama (871 vs. 809 ± 20 g/d; $P < 0,02$) e no período integral (997 vs. 907 ± 23 g/d; $P < 0,01$) do que nos animais no grupo Controle, e tendeu a ser maior também que dos animais em 1YC nos mesmos períodos (871 vs. 826 ± 20 g/d, $P = 0,08$ pré-desmama; e 997 vs. 944 ± 23 g/d, $P = 0,08$ período integral). O ganho médio de peso diário antes da desmama tendeu a ser maior em 2YC do que em 1YC, mas não houve diferenças entre os tratamentos com levedura e o grupo Controle ($371, 356$ e 417 ± 23 g/d; Controle, 1YC e 2YC, respectivamente; $P = 0,06$). Após a desmama, ambos os tratamentos com leveduras tiveram ganhos médios de pesos diários melhores que o grupo Controle ($744, 920, 941 \pm 65$ g/d; Controle, 1YC e 2YC, respectivamente; $P < 0,05$). No período integral, ganho médio diário de peso foi significativamente maior para bezerros do grupo 2YC do que para bezerros no grupo Controle (505 vs. 437 ± 22 g/d; $P < 0,05$) e tendeu a ser maior do que para bezerros em 1YC (505 vs. 444 ± 22 g/d; $P = 0,05$). Maior ganho de peso para animais no grupo 2YC no período integral resultou em tendência para maior peso corporal para os mesmos à desmama ($55,05, 55,05$ e $58,57 \pm 1,40$ kg; Controle, 1YC e 2YC, respectivamente; $P = 0,08$). Animais recebendo 2YC chegaram ao final do experimento significativamente mais pesados do que animais no grupo Controle ($65,28$ vs. $60,17 \pm 1,54$ kg, $P < 0,03$) e tenderam a chegar mais pesados do que animais em 1YC ($65,28$ vs. $61,40 \pm 1,54$ kg; $P = 0,08$). Animais recebendo ração com 2YC tenderam a requerer menos consumo por kg de ganho de peso do que animais no grupo Controle ($2,00$ vs. $2,25 \pm 0,11$ kg; $P = 0,07$), assim como também em relação aos animais em 1YC ($2,00$ vs. $2,25 \pm 0,11$ kg; $P = 0,09$). Bezerros recebendo 2YC também apresentaram melhor desenvolvimento nos parâmetros dos tecidos ruminais.

Galvão et al. (2005) observaram melhoras em ingestão de matéria seca, ganho médio de peso diário e parâmetros sanguíneos de bezerros alimentados com leveduras vivas. Os autores avaliaram os efeitos da suplementação com leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*, spp. *Boulardii*) em performance e saúde de bezerros holandeses com comprovada falha na transferência de imunidade passiva. Cinquenta e dois bezerros machos, com média de 5 dias de vida, foram aleatoriamente alocados em quatro tratamentos, sendo grupo Controle, grupo com leveduras vivas adicionadas à ração (SC), leveduras vivas adicionadas ao sucedâneo lácteo (SB) e leveduras vivas adicionadas tanto à ração quanto ao sucedâneo (SCSB). Todos os animais, exceto o grupo Controle, receberam 500 mg de produto contendo 10 bilhões UFC's. No início do experimento, amostras de sangue foram coletadas para dosagem de proteínas totais e IgG total. Os animais foram pesados no primeiro dia, e a cada 14 dias. Escore de

consistência fecal foi avaliado diariamente e amostras de fezes foram coletadas a cada duas semanas para isolamento de *E. coli*. Doenças, período de duração das doenças e tratamentos foram registrados. Concentrações séricas de IgG e de proteínas totais estavam abaixo do mínimo adequado para todos os tratamentos, o que representa falha em transferência de imunidade passiva. O consumo diário de matéria seca de ração, antes da desmama, foi maior para SC do que para bezerros em Controle (682,3 vs. 438,3 ± 73,8 g/d; $P < 0,05$); bezerros em SB tenderam a consumir mais que Controle (611,4 vs. 438,3 ± 73,8 g/d; $P < 0,10$). Nenhuma diferença estatística foi observada entre SCSB (500,0 ± 73,8 g/d) e os demais tratamentos, no que se refere a consumo diário de matéria seca de ração. Após a desmama, consumo de ração tendeu a ser maior em SC do que no grupo Controle (2.575,5 vs. 2.193,9 ± 150,0 g/d; $P < 0,10$), mas não houve diferença entre os outros tratamentos. Na análise do período integral do experimento (pré e pós-desmama), no consumo de matéria seca total (sucedâneo lácteo + ração), medido como percentagem do peso vivo, os animais em SC registraram maior consumo ($P < 0,05$), enquanto que os animais em SB registraram tendência a maior consumo ($P < 0,10$). Bezerros em SC tiveram maior ganho de peso no período pré-desmama do que animais no grupo Controle (464,7 vs. 298,0 ± 52,7 g/d; $P < 0,02$). Bezerros no grupo SB tenderam a ter maior ganho de peso diário no período pré-desmama do que animais no grupo Controle (416,7 vs. 298,0 ± 52,7 g/d; $P < 0,10$). Eficiência alimentar foi calculada dividindo o ganho diário pelo consumo diário de matéria seca total. Eficiência alimentar antes da desmama foi: 0,276, 0,401, 0,331 e 0,331 ± 0,050 g de ganho para cada g de consumo nos grupos Controle, SC, SB e SCSB, respectivamente, sendo SC o único tratamento que obteve resultado estatisticamente superior ao grupo Controle. Eficiência alimentar após a desmama foi estatisticamente igual para todos os tratamentos (0,431, 0,429, 0,425 e 0,417 ± 0,014 para os grupos Controle, SC, SB e SCSB, respectivamente). A adição das leveduras vivas à dieta dos bezerros não promoveu efeito sobre escore de consistência fecal. Bezerros dos grupos SC e SB tiveram menos dias em diarreia do que aqueles no grupo Controle antes da desmama, porém não houve diferença entre os animais do grupo SCSB e grupo Controle e nem nos outros tratamentos (5,83, 4,00, 4,00 e 5,50 dias em diarreia para grupos Controle, SC, SB e SCSB, respectivamente).

Villot et al. (2019) testaram uma cepa específica de levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*, spp. *boulardii*, em bezerros holandeses destinados à produção de vitelo. Oitenta e quatro animais foram alocados aleatoriamente em dois tratamentos, recebendo

diariamente via administração da dieta líquida, suplementação com leveduras vivas (SCB) ou placebo (CON). Consumo de sucedâneo lácteo foi mensurado diariamente e peso corporal foi medido semanalmente para avaliação de ganho de peso e eficiência alimentar. Amostras de fezes foram coletadas nos dias 0, 14 e 49 para exame do perfil de bactérias e quantificação da levedura testada. Foram registrados diariamente escores de consistência fecal, desidratação e atitude, bem como duração das doenças e número de dias necessários para recuperação. Houve significativo aumento na quantidade de leveduras nas fezes em SCB nos dias 14 e 49 em relação ao dia 0 e em relação aos bezerros tratados com placebo, o que indicou boa capacidade de sobrevivência das leveduras no trato gastrointestinal ($P < 0,05$). A adição de SCB ao sucedâneo lácteo não afetou ganho médio de peso diário (585 ± 24 vs. 572 ± 22 g/d em CON e SCB, respectivamente). O peso final foi similar para ambos os tratamentos ($74,5 \pm 1,1$ e $73,5 \pm 1,0$ kg em CON e SCB, respectivamente). Dentre os animais em controle, os que tiveram diarreia tiveram um ganho médio diário menor (524 ± 29 g/d) em comparação aos que não tiveram diarreia (654 ± 38 g/d; $P = 0,038$), e um peso corporal final também menor ($72,1 \pm 1,3$ kg vs. $76,8$ kg $\pm 1,6$ kg, $P = 0,048$). Já dentre animais que receberam a levedura, os que tiveram diarreia mantiveram o mesmo ganho médio diário de peso dos que não tiveram diarreia (572 ± 31 g/d), e peso corporal final também similar ($73,9 \pm 1,4$ kg para diarreicos vs. $73,0 \pm 1,3$ kg para não diarreicos). Quanto à eficiência alimentar (ganho diário \div consumo de matéria seca de sucedâneo), não houve diferença significativa entre os tratamentos ($0,33$ vs. $0,37 \pm 0,04$ g, CON e SCB respectivamente; $P = 0,905$). Ao todo, 8 bezerros morreram durante o experimento, sendo 6 do tratamento controle e 2 do tratamento com SCB. Bezerros em SCB apresentaram menores chances de escore de consistência fecal acima de 2 ($P < 0,001$), assim como um decréscimo significativo no escore médio de consistência fecal geral ($P < 0,05$); 69,1% dos bezerros em CON apresentaram ao menos um caso de diarreia, enquanto que 50% dos bezerros em SCB apresentaram ao menos um caso de diarreia. Bezerros suplementados com as leveduras tiveram tendência a menores chances de desenvolverem diarreia que bezerros em controle ($P = 0,081$) e, quanto a casos de diarreia severa, os bezerros em SCB tiveram significativo decréscimo em chances de desenvolvimento de casos ($P = 0,036$). O número de dias em escores acima de 1 para atitude e para desidratação foi menor em bezerros em SCB do que em bezerros em CON ($P < 0,001$). O número de bezerros tratados para mitigação de casos de diarreia foi significativamente menor em SCB do que em CON ($14,3$ vs. $33,3\%$; $P = 0,048$).

He et al. (2017), Fomenky et al. (2017) e Villot et al. (2019) afirmam que potenciais efeitos benéficos no tratamento de bezerros com leveduras nas questões relacionadas a consumo, ganho de peso e eficiência alimentar poderiam ser melhores observados em condições de ambiente com mais altos desafios sanitários. Villot et al. (2019) afirmam ainda que a suplementação com leveduras tem alto potencial para ajudar os animais a superar os períodos de maior desafio sanitário, como por exemplo, no começo da vida.

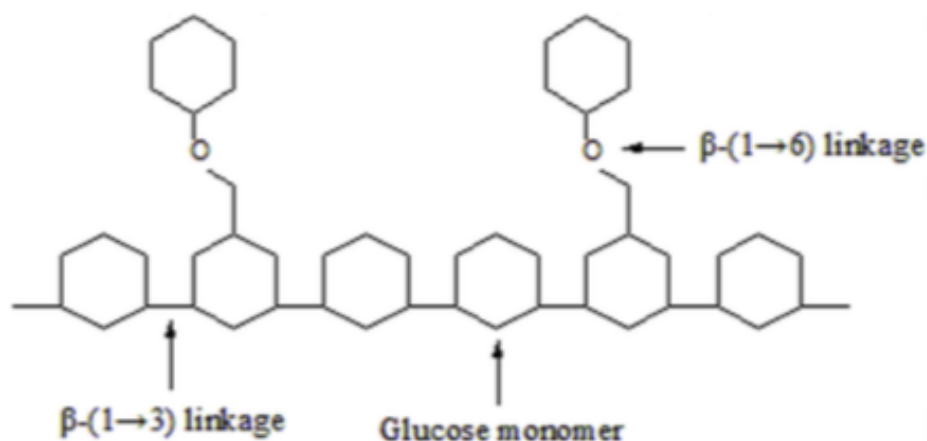
4.3. β -glucanos na nutrição de bezerros

β -glucanos são polissacarídeos macromoleculares que se consistem de monômeros de D-glicose ligados através de pontes β -glicosídicas, que estão presentes em plantas e microrganismos (DU et al., 2014). Os β -glucanos são geralmente encontrados como o principal componente de parede celular de cereais, fungos, algumas bactérias e algas marinhas (BACIC; STONE, 1981; BERESFORD; STONE, 1983; BUCKERIDGE et al., 2004; WOOD et al.; 1983). Os β -glucanos de fungos e bactérias possuem ligações β (1, 3) e β (1, 6) (ZHU et al., 2016).

Cereais são a principal fonte de β -glucanos e dominam a produção mundial de β -glucanos (SKENDI et al., 2003). Os β -glucanos de cereais exibem apenas solubilidade parcial em água em função de sua estrutura diversa (VAIKOUSI et al., 2004). Os β -glucanos de microrganismos se consistem de uma espinha dorsal central linear de resíduos de glicose ligados via ligações β (1, 3), e frequentemente possuem também cadeias ramificadas de glicose de vários tamanhos ligadas via ligações β (1, 6) (BROWN; GORDON, 2005; CHIHARA, 2001). Em fungos, β -glucanos contribuem para cerca de metade da massa total de sua parede celular (MCINTOSH et al., 2005). Dentre os métodos de extração dos β -glucanos estão a extração com água quente, extração álcali (KAO et al., 2012), extração enzimática (PARK et al., 2014) e extração ácida (PARK et al., 2001). As diversas espécies de fungos contêm β -glucanos específicos, que diferem entre si pela quantidade de (1 \rightarrow 6) cadeias laterais ligadas. Além disso, o conteúdo e as proporções de β -glucanos em fungos são determinados principalmente pelo seu perfil genético e diferem entre espécies e até cultivares. Após a ingestão, os glucanos fúngicos afetam o sistema imunológico da mucosa no trato gastrointestinal. Semelhante aos antígenos, a captação de β -glucanos ocorre através de células M localizadas no intestino delgado. As células M subsequentemente apresentam o antígeno ou β -glucano em suas superfícies basais para células imunes, como

macrófagos e células dendríticas. Aqui, as partículas de β -glucano se ligam aos macrófagos com a ajuda da dectina-1, o principal receptor para a maioria dos β -glucanos insolúveis. Subsequentemente, a dectina-1 induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias via fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e vários processos inflamatórios e imunorreguladores interconectados, como quimiocinese e quimiotaxia (GOODRIDGE et al, 2009).

Figura 1: Representação esquemática de um fragmento de β -glucano com ligações β (1, 3) e ramificações em β (1, 6).



Adaptado de Bai et al. (2019)

As funcionalidades nutricionais e sanitárias dos β -glucanos têm relação com suas propriedades físico-químicas. Essas propriedades, como solubilidade, viscosidade e gelificação são determinadas pelas suas características moleculares (AHMAD et al., 2012), incluindo peso molecular e estrutura. β -glucanos solúveis têm se mostrado mais saudáveis para a saúde humana do que β -glucanos insolúveis, pois este último apresenta benefícios apenas do ponto de vista dietético por exercer papel de fibra.

Os β -glucanos têm recebido cada vez mais atenção em função de seus efeitos imunomoduladores. Aoki et al. (2015) citam ativação do sistema imunológico no intestino delgado. Maity et al. (2015) relatam estimulação de macrófagos, esplenócitos e tímócitos a partir do uso de β -glucanos como agentes imuno-estimuladores. Ma et al. (2015) encontraram estimulação do aumento na concentração de imunoglobulinas e estimulação da fosfatase alcalina em dietas utilizando β -glucanos de leveduras. Jellmayer et al. (2017) e Tondolfo et al. (2017) verificaram, *in-vitro*, que β -glucanos significativamente aumentaram proliferação de linfócitos e de citocinas como IL-2, IL-

6, IL-10 e TNF α . Alguns achados têm sugerido que β -glucanos podem induzir e aumentar a concentração de cortisol, algo que tem sido proposto como um importante mecanismo para melhoria do sistema imunológico inato em peixes (FRANCO MONTROYA et al., 2017). Mo et al. (2017) relatam efeitos anti-tumorais de β -glucanos de leveduras *S. cerevisiae*, o que pode ser atribuído às propriedades imuno-estimulantes e às competências para indução de apoptose desses polissacarídeos. Han et al. (2017) observaram que β -glucanos de leveduras melhoraram a barreira intestinal e reduziram processos inflamatórios na mucosa intestinal pela inibição da expressão de mediadores inflamatórios e melhorando a expressão de proteínas de *tight junctions* que são associadas com a permeabilidade intestinal. Brown & Gordon (2003) afirmam que β -glucanos com alto peso molecular podem ativar diretamente leucócitos e modular a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que os de baixo peso molecular ativam leucócitos via estimulação de fatores de transcrição nuclear.

Fronte et al. (2019) afirmam que macrófagos estão envolvidos com regeneração tecidual e, de acordo com os autores, os β -glucanos poderiam positivamente afetar o processo através da ativação de macrófagos. Objetivando avaliar tal potencial, os autores investigaram o efeito da administração oral de β (1, 3) (1, 6) glucano na regeneração da cauda amputada de *zebrafish*. Os resultados mostraram que a suplementação com β (1, 3) (1, 6) glucano reduziu a mortalidade dos peixes e melhorou a taxa de regeneração da cauda nos animais amputados.

De acordo com Luo et al. (2019), os β -glucanos são cada vez mais utilizados como importante alternativa aos antibióticos em dietas de leitões em crescimento e engorda, para a necessária e almejada sustentabilidade na indústria da suinocultura chinesa. O potencial para modulação na função intestinal através do uso dos β -glucanos é ferramenta fundamental para redução da incidência de doenças e melhora na taxa de crescimento de leitões. Os autores detectaram que β -glucanos oriundos de *Agrobacterium sp.* modularam positivamente a função intestinal através da regulação da função da barreira mucosa e da população de microrganismos, bem como melhoraram as taxas de ganho de peso em leitões submetidos a desafios por lipopolissacarídeos.

Chae et al. (2006) mostraram que a suplementação com β -glucano na dose de 0,04% da matéria original total, em frangos de corte foi benéfica, causando aumento das células CD8+. Em suínos, resposta aos β -glucanos foi demonstrada com 0,02% de inclusão, quando estes animais tiveram elevação das células T *helper* e T citotóxicas após 8 semanas de experimento (HAHN et al., 2006). Esses autores também observaram

efeitos positivos sobre a digestibilidade para a matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo, cálcio e fósforo.

Aumento na secreção de citocinas mediante suplementação com β -glucano já foi demonstrado em diversas espécies (OLSON et al., 1996; BERNER et al., 2005). O β -glucano parece atuar mediante estímulo à produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas, como TNF- α , IL-1, IL-6, INF- γ e IL-8. Seu efeito está relacionado à ação em monócitos/macrófagos, ativando estas células e direcionando a resposta imune para o tipo Th1 (BARAN et al., 2007).

Ma et al. (2015) objetivaram investigar os efeitos da suplementação com β -glucanos de leveduras em bezerros (2 ± 1 dia de vida), no desempenho e no perfil sérico de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA. Quarenta e dois bezerros machos holandeses foram aleatoriamente alocados em seis tratamentos. Os animais receberam sucedâneo lácteo e cada grupo recebeu, respectivamente: 0 (Controle), 25, 50, 75, 100 ou 200 mg/Kg de consumo, de β -glucano purificado (82,75% de pureza) de levedura. Cada animal recebeu 10% do peso vivo em sucedâneo lácteo por dia, e o nível de fornecimento foi ajustado a cada duas semanas. O experimento teve duração de 56 dias. O consumo diário de matéria seca de sucedâneo lácteo e de ração foram registrados e os bezerros foram pesados nos dias 0, 14, 28, 42 e 56. As fezes foram coletadas durante os dias 18 a 20 e 46 a 48. Amostras de sangue foram coletadas de três animais fixos em cada grupo nos dias 0, 14, 28 e 42. Os efeitos no ganho de peso diário, no consumo de matéria seca e na eficiência alimentar foram divididos e analisados por período de 0 a 28 dias, de 28 a 56 dias e período integral (0 a 56 dias). Os ganhos de peso diários, no período 0 a 28 dias, foram 178,6, 186,4, 187,9, 205,0, 185,0, $189,3 \pm 3,89$ g/d para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Houve diferença estatística no grupo 75 mg/kg, com ganho de 205,0 g/d ($P < 0,05$) e foi significativamente maior do que todos os outros grupos. Não houve diferença estatística nos consumos diários de matéria seca, no período 0 a 28 dias, que foram 492,5, 521,3, 517,6, 534,4, 467,4 e $511,2 \pm 10,53$ g/d para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. As eficiências alimentares (ganhos \div consumo), no período de 0 a 28 dias, foram 0,36, 0,35, 0,36, 0,48, 0,40, $0,37 \pm 0,02$ para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Houve diferença estatística somente para o grupo 75, que teve eficiência alimentar de 0,48 ($P < 0,05$). Os ganhos de peso diários, no período 28 a 56 dias, foram 307,9, 362,8, 399,4, 429,9, 344,8 e $330,7 \pm 19,44$ g/d para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg),

respectivamente. Os grupos 50 e 75 mg/kg, que ganharam 399,4 e 429,9 g/d ($P < 0,05$) foram significativamente maiores do que todos os outros grupos. Os consumos diários de matéria seca, no período 28 a 56 dias, foram 555,2, 586,8, 583,4, 624,3, 532,7 e $578,0 \pm 12,89$ g/d para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Novamente, o grupo 75 foi significativamente maior ($P < 0,05$). As eficiências alimentares, no período de 28 a 56 dias, foram 0,55, 0,62, 0,69, 0,69, 0,65 e $0,57 \pm 0,02$ para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Grupos 50 e 75 foram estatisticamente melhores ($P < 0,05$). Para a avaliação do período integral (0 a 56 dias), o ganho de peso diário foi 242,3, 280,2, 291,5, 320,0, 259,8 e $261,8 \pm 12,4$ g/d para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Grupo 75 foi novamente estatisticamente superior, com ganho de 320,0 g/d ($P < 0,05$). O consumo diário de matéria seca foi 526,6, 553,2, 548,1, 580,5, 503,9 e $544,9 \pm 11,06$ g/d para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Não houve diferença estatística. E, por fim, a eficiência alimentar foi 0,44, 0,46, 0,48, 0,57, 0,49 e $0,45 \pm 0,02$ para cada tratamento (Controle, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/kg), respectivamente. Grupo 75 foi estatisticamente superior com 0,57 de eficiência alimentar ($P < 0,05$). A suplementação com os β -glucanos não apresentou efeitos sobre concentração de IgA. As concentrações séricas de IgG no dia 48 e IgM nos dias 28 e 42 aumentaram de forma quadrática com a elevação nos níveis de suplementação com os β -glucanos ($P < 0,05$). O aumento na concentração sérica de IgG pode indicar que houve melhora no sistema imune não específico humoral.

De acordo com Williams et al. (1996), os macrófagos e os neutrófilos de mamíferos possuem receptores em sua superfície para β -glucanos. É possível, portanto, que os β -glucanos, se ligando a esses receptores, estimulem macrófagos e melhorem o sistema imunológico em mamíferos.

Eicher et al. (2010) objetivaram verificar se derivados de parede celular de leveduras (1,8% de β -glucanos ou 70% de β -glucanos), em combinação com ácido ascórbico, podem intensificar a imunidade inata e mediar estresse de transporte em bezerros neonatais. Trinta e nove bezerros passaram pelo transporte rodoviário entre os 3 e 10 dias vida. Variáveis foram medidas 28 dias após o transporte. Aos 24 dias de vida bezerros foram descornados e colocados em blocos de três tratamentos: Controle (CNT), derivados de leveduras 1,8% de pureza em β -glucanos + ácido ascórbico (BG2), ou derivados de leveduras 70% de pureza em β -glucanos + ácido ascórbico (BG70). As suplementações foram de 113 g por fornecimento do β -glucano 1,8% + 250 g por

fornecimento do ácido ascórbico, 150 mg por fornecimento do β -glucano 70% + 250 g por fornecimento do ácido ascórbico, 2x por dia através da dieta líquida. No dia do transporte, aproximadamente 2,5 h após a refeição da manhã, os bezerros foram pesados, amostras de sangue e fezes coletadas e induzidos a adentrar o caminhão para o transporte rodoviário por 4 horas de viagem. A suplementação se iniciou na refeição noturna dos animais, após o transporte. Animais foram pesados semanalmente. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0 (antes do transporte), 3, 7, 10, 13, 21 e 28. Células brancas totais foram mensuradas, bem como células mononucleares periféricas (PBMC) e granulócitos, e o potencial fagocitário e oxidativo de neutrófilos foi determinado. Amostras de fezes foram analisadas para presença de *Salmonella* e *E. coli*. Pesos corporais foram estatisticamente iguais para todos os tratamentos em todos os dias de pesagem. Ganhos médios de peso diário foram estatisticamente iguais para todos os tratamentos em todos os dias de pesagem, sendo: dia 7 (259 ± 79 , 285 ± 73 e 357 ± 82 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente), dia 14 (297 ± 79 , 203 ± 73 e 166 ± 86 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente), dia 21 (492 ± 79 , 431 ± 78 e 376 ± 90 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente) e dia 28 (492 ± 67 , 506 ± 64 e 531 ± 75 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente). Consumo médio total de matéria seca (sucedâneo lácteo + ração) apresentou diferença estatística somente no último dia de medições (dia 28) ($P < 0,05$), sendo: dia 7 (650 ± 103 , 614 ± 95 e 593 ± 108 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente), dia 14 (843 ± 103 , 703 ± 95 e 697 ± 108 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente), dia 21 (995 ± 103 , 1.057 ± 95 e 1.029 ± 108 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente) e dia 28 (1.552 ± 103 , 1.161 ± 82 e 1.036 ± 92 g/d para CNT, BG2 e BG70, respectivamente). No dia 28, portanto, o consumo do grupo Controle foi maior do que dos outros dois grupos. Quanto à eficiência alimentar (ganho \div consumo) não houve diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos dias analisados, sendo: dia 7 ($0,40 \pm 0,12$, $0,57 \pm 0,12$ e $0,60 \pm 0,13$ para CNT, BG2 e BG70, respectivamente), dia 14 ($0,37 \pm 0,12$, $0,32 \pm 0,12$ e $0,26 \pm 0,13$ para CNT, BG2 e BG70, respectivamente), dia 21 ($0,51 \pm 0,12$, $0,44 \pm 0,12$ e $0,34 \pm 0,13$ para CNT, BG2 e BG70, respectivamente) e dia 28 ($0,35 \pm 0,10$, $0,46 \pm 0,09$ e $0,64 \pm 0,11$ para CNT, BG2 e BG70, respectivamente). Quanto à contagem de células brancas, o dia 28 foi o único dia onde houve diferença estatística entre os tratamentos, tendo BG70 ficado com contagem estatisticamente menor que BG2 e CNT ($P < 0,05$). Não houve diferenças detectadas entre os tratamentos em nenhum dos dias de análise quanto à contagem de granulócitos. Contagem de PBMC foi maior para BG2

do que para CNT no dia 3 ($P = 0,006$). Animais em BG70 tiveram menor PBMC do que BG2 no dia 21 ($P = 0,03$) e no dia 28 ($P = 0,05$). Bezerros em BG70 tiveram menos células positivas para fagocitose do que CNT ($P = 0,02$) e tenderam a ter menos também do que BG2 ($P = 0,08$). A frequência de *Salmonella* não foi diferente entre os tratamentos. BG2 apresentou maior porcentagem de animais positivos para *E. coli* nas fezes do que BG70 e do que CNT no dia 7.

Persson Waller et al. (2003) avaliaram os efeitos da infusão intramamária de β -glucanos de leveduras na secagem de vacas leiteiras sobre a capacidade do úbere de resistir à infecção crônica por *Staphylococcus aureus* em vacas lactantes. Outro objetivo foi avaliar os efeitos dos β -glucanos de leveduras sobre a expressão dos MHC classe II (complexos de histocompatibilidade) nos leucócitos mamários. Os apresentadores de antígenos MHCII são necessários para a ativação das células T-helper, iniciando, portanto, a resposta imune mediada por células, promovendo ativação de macrófagos e produção de anticorpos. Os resultados indicaram um leve efeito positivo dos β -glucanos na secagem das vacas tanto em respostas clínicas quanto antibacterianas à infecção por *S. aureus* (não estatisticamente significativo). Entretanto não houve resposta terapêutica nas vacas em lactação com infecções crônicas. Houve tendência de aumento na proporção de MHCII e de linfócitos no leite após a infusão com os β -glucanos, indicando ganhos na competência do sistema para a apresentação de antígenos.

McDonnel et al. (2019) mediram performance, comportamentos, metabólitos e respostas imunológicas em bezerros holandeses e lactentes suplementados com β -glucanos de algas marinhas. Quarenta e quatro bezerros machos, com $13,7 \pm 2,5$ d e pesando $48,0 \pm 5,8$ kg, foram amamentados em sistema de aleitamento automático. Cada bezerro recebeu 5 L de sucedâneo lácteo por dia, e foram alocados em quatro tratamentos: (1) Controle (CON); (2) um tratamento a base apenas de ácidos graxos poli-insaturados (FO); (3) 1 g de β -glucanos por dia (GL); (4) tratamento com ácidos graxos poli-insaturados + 1 g de β -glucanos por dia (FOGL), num modelo fatorial 2 x 2. Sucedâneo lácteo e concentrados foram oferecidos dos 0 aos 62 dias pré-desmama, e concentrado somente continuou a ser ofertado após a desmama por mais 31 dias. Consumo diário e comportamento alimentar diário foram mensurados, assim como peso corporal e coleta de sangue para análise de metabólitos em intervalos regulares. Consumo médio de matéria seca ao longo de todo o experimento (0 aos 93 dias) foi 1,39, 1,27, 1,00 e 0,72 kg/d para os grupos CON, FO, GL e FOGL, respectivamente ($P < 0,0001$). Bezerros suplementados com GL estavam significativamente mais leves ($P <$

0,0001) à desmama (62 d) e ao final do experimento (93 d). Suplementação com GL resultou em maiores concentrações sanguíneas de haptoglobina ($P = 0,034$) e menor nível de linfócitos ($P = 0,027$). Os autores concluíram que a suplementação dos bezerros com os β -glucanos falharam em gerar quaisquer efeitos positivos seja em desempenho ou em parâmetros imunológicos, tanto em pré- quanto em pós-desmama. A suplementação pode ter inclusive promovido efeitos deletérios nos animais, considerando que tiveram menores consumos de matéria seca do que os animais do grupo controle, bem como menores pesos corporais tanto à desmama quanto ao final do experimento.

Kido et al. (2019) conduziram experimento para avaliar os efeitos da suplementação com β -glucanos no desempenho de bezerros de corte à pasto desde as 4 semanas pré-desmama e até as 12 a 16 semanas pós-desmama. Nove bezerras (2,9 meses de vida) foram alocadas em grupos Controle (CON) ou experimental (CEL). Ganho médio de peso diário tendeu a ser maior em CEL do que em CON, especialmente 1 mês após a desmama. Os autores afirmam que os β -glucanos suplementados a bezerros de corte à pasto podem afetar positivamente a microbiota ruminal e modificar características fermentativas, levando, portanto, a um melhor e mais positivo ambiente ruminal nos animais.

4.4. Imunologia básica em bezerros

O nascimento de bovinos é marcado por uma série de mudanças e adaptações fisiológicas ao ambiente extrauterino, as quais podem sofrer complicações por eventos tais como distocias e adaptação neonatal inadequadas, predispondo os neonatos a algumas enfermidades (GOMES et al., 2021).

Como explicam Barrington & Parish (2001), os bovinos neonatos são imunodeficitários. A inabilidade para iniciar uma resposta imune adequada pode ser atribuída à imaturidade dos mecanismos de proteção e ao atraso na geração das imunidades humoral e celular. A concentração de linfócitos B na circulação de bezerros neonatos corresponde a aproximadamente 30% da encontrada em animais adultos e as imunoglobulinas produzidas por essas células, somente serão encontradas na circulação sanguínea alguns dias após o nascimento. Similarmente à imunidade humoral, a imunidade mediada por células é deficiente em recém-nascidos. Somente na segunda semana de vida, aproximadamente, os bezerros alcançam níveis similares a animais adultos na resposta mediada por células.

Gomes et al. (2021) apontam que as bezerras nascem agamaglobulinêmicas em virtude da placenta sinepteliocorial dos bovinos, o que impede a transferência placentária de anticorpos ao feto. Além disto, neonatos possuem sistema imune suprimido em função da interação entre os hormônios e citocinas presentes no ambiente materno-fetal.

De acordo com levantamento do USDA (2018), a taxa de mortalidade de bezerros em aleitamento é de aproximadamente 5 a 6,3%, sendo as principais causas a diarreia neonatal e a doença respiratória bovina, seguida das inflamações umbilicais. A morbidade por diarreia pode acometer entre 90 e 100% dos neonatos com até três semanas de idade, podendo levar a uma incidência de até 56% durante todo o período de aleitamento. Além disto, animais que apresentaram diarreia possuem alta probabilidade de manifestarem doença respiratória (SVENSSON et al., 2003). Considerando os impactos futuros na vida de bezerras, animais que apresentaram diarreia tiveram aumento da idade ao primeiro parto e redução na produção de leite na primeira lactação (AGHAKESHMIRI et al., 2017). As lesões pulmonares irreversíveis causadas pelas broncopneumonias promoveram redução do ganho de peso diário e diminuição da produtividade na primeira lactação (VIRTALA et al., 1996; STANTON et al., 2012), maior risco de não sobreviverem até um ano de vida (ADAMS; BUCZINSKI, 2016), além de causar aumento da idade ao primeiro parto e menor produção de leite (GORDEN; PLUMMER, 2010). Diarreia ou pneumonia em bezerras leiteiras nos primeiros quatro meses de vida promoveram impacto negativo na produção de leite futura, bem como nos teores de gordura e proteína do leite (HEINRICHS; HEINRICHS, 2011). Casos clínicos envolvendo septicemia, diarreia, pneumonia e tristeza parasitária continuam sendo, no Brasil, as principais causas de mortalidade entre bezerros no período de aleitamento (COELHO, 2009). Estas doenças têm impacto negativo e são responsáveis por redução no consumo de alimentos, perda de peso e, nos casos de infecções graves, perda de animais e altos gastos com medicamentos. Até 30 dias, os maiores desafios para os bezerros são as diarreias e os problemas respiratórios, enquanto que de 30 a 120 dias, na maioria das vezes são tristeza parasitária e problemas respiratórios (COELHO, 2009).

Portanto, a não ser que adequada transferência de imunidade passiva seja realizada através da colostragem, bezerros neonatos podem ter grande probabilidade de sucumbir a infecções, mesmo por agentes que poderiam ser inócuos a animais adultos ou imuno-competentes (BARRINGTON; PARISH, 2001).

4.4.1. Estresse e sistema imunológico

Eventos estressantes são associados à supressão do sistema imune (BLECHA et al., 1984; SEVI et al., 2001) e aumento da susceptibilidade a doenças em animais (BURTON et al., 1995). De acordo com Toates (1995), os hormônios adrenais têm sido reconhecidos como fortes indicadores de estresses em bovinos.

Collier et al. (2017) afirmam que o estresse pode ser entendido como qualquer situação que tira o animal da zona de conforto. Por definição, há duas respostas à situação de estresse: aguda ou crônica. A fase aguda consiste em mudanças comportamentais nos animais, como vocalização, defecação e inquietação. Na fase crônica, é possível observar resposta inflamatória indesejável (sem patógeno envolvido), o que causa alteração nos parâmetros sanguíneos dos animais, principalmente aumento de cortisol e de proteínas de fase aguda (haptoglobina).

Hickey et al. (2003) detectaram que a concentração de cortisol plasmático aumentou significativamente em bezerros após reagrupamento social, mas não perceberam aumento importante no evento desmama. Já a concentração plasmática de noradrenalina aumentou significativamente na desmama, que ainda levou ao decréscimo, de forma significativa, da proporção plasmática de linfócitos e aumento da de neutrófilos. Os autores detectaram ainda que a resposta de INF- γ foi atenuada em eventos de reagrupamento social dos animais e também na desmama. A produção de INF- γ , de acordo com Wood & Seow (1996), é associada com estímulos de linfócitos da família T CD4 do tipo Th1, que fazem parte da imunidade mediada por células na resposta imunológica adaptativa.

Goshen & Yirmiya (2009) afirmam que a citocina pró-inflamatória interleucina 1 (IL-1), produzida após exposição a desafios imunológicos e fisiológicos, desempenha um importante papel na resposta neuroendócrina de produção de hormônios relacionados aos comportamentos ligados ao estresse. Citocinas pró-inflamatórias, que são produzidas predominantemente por células ativadas do sistema imune inato como monócitos, macrófagos e micróglia, desempenham um papel fundamental nas respostas neuroendócrinas e comportamentais a vários desafios estressantes. A IL-1 é a primeira citocina a ser associada com modulação do sistema neuroendócrino, particularmente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). A IL-1 é, portanto, um mediador crítico das

respostas adaptativas ao estresse. A expressão do gene de IL-1 e a produção da proteína IL-1 são elevadas durante vários tipos de enfermidades, nos quais a IL-1 exerce papel de orquestração das resposta inflamatória. Como exemplo, ela pode aumentar a produção de anticorpos, induzir a produção de outras citocinas e aumentar o desenvolvimento de clones de células T. Adicionalmente, a IL-1 media a chamada “síndrome do comportamento enfermo”, um conjunto de sinais neurofisiológicos e neurocomportamentais que acompanham a ativação do sistema imune e reações inflamatórias. Experimentos com humanos e em animais demonstram que vários tipos de agentes estressantes, incluindo imunológicos, fisiológicos ou psicológicos, induzem a produção de IL-1 tanto periférica quanto no cérebro. Elevações nos níveis de IL-1 associadas a exposição crônica a fatores estressantes induz depressão, inclusive via secreção de glicocorticoides. IL-1 cerebral media efeitos tanto dos fatores estressantes crônicos quanto dos agudos. Pequenos níveis de IL-1, sob algumas condições fisiológicas, podem promover respostas adaptativas necessárias para adequado enfrentamento da situação estressante.

Quanto a um dos eventos estressantes mais comuns em bezerras leiteiras, Canozzi et al. (2019), em meta-análise, não observaram evidências consistentes de um efeito sobre o cortisol na descorna com o uso de ferro quente. O aumento transitório da concentração de cortisol foi normalmente reduzido pela administração de anestésico local (MELLOR; STAFFORD, 1997) ou terapia multimodal (HUBER et al., 2013), sugerindo que o alívio da dor pode reduzir o cortisol a níveis basais. No entanto, quando a descorna com ferro quente foi realizada sem alívio da dor, o aumento na resposta do cortisol foi maior em 30 min (SINCLAIR, 2012), 60 min (STILWELL et al., 2012) e 120 min (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2005) pós-tratamento do que no grupo descornado com alívio da dor. Além disso, diferenças sutis na técnica podem ser responsáveis por diferenças relatadas em estudos usando descorna térmica (DOHERTY et al., 2007). Conforme concluído por Graf & Senn (1999), os bovinos experimentaram considerável estresse e dor por cauterização por calor, com uma resposta aguda de cortisol moderada (55%) (MELLOR; STAFFORD, 1997). Canozzi et al. (2019) demonstraram, como conclusão da meta-análise, que a descorna reduz o bem-estar de bovinos pelo aumento da concentração de cortisol e do número de vocalizações; no entanto, não alterou o ganho médio de peso diário. A anestesia local não reduziu o sofrimento induzido pela dor, medido pelo nível de cortisol, após a descorna.

4.4.2. Citocinas

Oliveira et al. (2011) afirmam que citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (LIN et al., 2000; SOMMER; WHITE, 2010). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células alvo a produzirem mais citocinas (ZHANG; AN, 2007). Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, há as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e fator de necrose tumoral (TNF α). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10 e IL-13 (SOMMER; WHITE, 2010; CURFS et al., 1997).

As primeiras citocinas formadas após lesão tecidual ou infecção são IL-1 β e TNF α , as quais atuam diretamente sobre receptores específicos dos neurônios sensitivos e levam à síntese em cascata de outras citocinas, quimiocinas, prostanoídes, neurotrofinas, óxido nítrico, cininas, lipídeos, trifosfato de adenosina (ATP) e membros da via do complemento. Esses elementos, por sua vez, causam proliferação e hipertrofia de células gliais no sistema nervoso central, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias relevantes como TNF α , IL-1 β e IL-6, formando uma rede complexa de ativação interdependente (ZHANG; AN, 2007; SHAVIT et al., 2006; OBATA et al., 2006; MILLER et al., 2009).

4.4.2.1. Interleucina 1 (IL-1)

De acordo com Oliveira et al. (2011) a IL-1 é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Há dois tipos conhecidos: IL-1 α e IL-1 β , com 31 e 33 kDa, respectivamente. IL-1 α é marcadamente associada a membranas celulares e age através de contatos celulares. A IL-1 β produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclo-oxigenase-2, com a formação de PGE₂ no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância-P (SP), óxido nítrico (NO) e moléculas de adesão endotelial, tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória (LIN et al., 2000; ZHANG; AN, 2007; RAEBURN et al., 2002).

4.4.2.2. Interleucina 4 (IL-4)

Oliveira et al. (2011) afirmam que a IL-4 é uma glicoproteína de 15 kDa, com propriedades anti-inflamatórias e produzida por linfócitos-T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Tem ação sobre os linfócitos T e B, células *Natural Killers*, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais. Induz a diferenciação de linfócitos B para produzir IgE e IgG, que são imunoglobulinas importantes nas respostas alérgicas e anti-helmínticas. Atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF α , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio.

De acordo com Brown et al. (1998), IL-4 pode regular positiva ou negativamente a produção de outra citocina chamada interferon- γ (INF γ).

4.4.2.3. Interleucina 6 (IL-6)

Segundo Oliveira et al. (2011) a IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por múltiplos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia, sendo TNF α e IL-1 potentes indutores. Causa febre e ativa o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos T citotóxicos e células *Natural Killer* (LIN et al., 2000; CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002).

Essa interleucina é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, operação e queimadura. Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias. É considerado o marcador mais relevante do grau de lesão tecidual durante um procedimento cirúrgico, em que o aumento excessivo e prolongado está associado a uma morbidade pós-operatória maior (LIN et al., 2000; GEBHARD et al., 2000; KATO et al., 1997).

4.4.2.4. Fator de necrose tumoral (TNF α)

Oliveira et al. (2011) afirmam que o TNF α , também conhecido como caquetina, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos T. Desempenha funções importantes na hiperalgesia inflamatória e na hiperalgesia neuropática.

Após procedimento cirúrgico, trauma ou durante as infecções, o TNF α é um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Outras ações do TNF α consistem em: ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE₂, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanoides, e influenciar a apoptose celular (CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002).

4.4.3. Proteínas de fase aguda

A resposta de fase aguda é uma resposta do animal a distúrbios em sua homeostase causados por infecção, lesão tecidual, crescimento neoplásico ou desordens imunológicas (HEINRICH et al., 1990). Haptoglobina e *Serum Amyloid A* são consideradas as principais proteínas de fase aguda em bovinos, uma vez que sua concentração aumenta fortemente durante a fase de resposta aguda (CONNER et al., 1986; ALSEMGEEST et al., 1994).

Bioquimicamente, a haptoglobina é uma glicoproteína que faz parte do grupo das alfa-2-globulinas (ELSON, 1974). A sua função primária é prevenir a perda de ferro sanguíneo pela formação de complexos estáveis com a hemoglobina livre no sangue (LAURELL; NYMAN, 1957). Por este motivo, esta proteína desempenha uma atividade bacteriostática através da restrição do ferro necessário ao crescimento bacteriano (EATON et al., 1982).

Durante processos inflamatórios e infecciosos, uma larga produção hepática de haptoglobina ocorre a partir de estímulos gerados através da secreção das citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IL-1 e IL-6 pelos macrófagos no local da lesão (KURASH et al., 2004; MURATA et al., 2004). Além da produção hepática, leucócitos migram para o sítio inicial da infecção e contribuem para a expressão desta proteína *in loco*, sendo também sintetizada e liberada em menor quantidade por neutrófilos em resposta à sua ativação (THIELEN et al., 2005; THIELGAARD-MONCH et al., 2006).

Bovinos saudáveis apresentam níveis médios de haptoglobina sanguínea de 0,01 g/L, enquanto que animais em quadros infecciosos agudos podem apresentar níveis médios de até 1,62 g/L (SKINNER et al., 1991; ECKERSALL et al., 1999).

Panndorf et al. (1976) afirmam que a concentração de haptoglobina em bovinos em situações de inflamações agudas tende a aumentar rapidamente para aproximadamente 100 mg/L. Os autores afirmam ainda que, em algumas situações, como puerpério em vacas leiteiras, a concentração sérica de proteínas de fase aguda aumenta fisiologicamente.

Humblet et al. (2006) mensuraram concentrações séricas de haptoglobina em vacas leiteiras no período periparto, desde uma semana antes do parto e até 15 ou 16 semanas pós-parto. Tais mensurações foram realizadas em vacas clinicamente saudáveis e doentes. Os autores objetivaram investigar a utilidade desse marcador como preditor de condição sanitária dos animais e, para tanto, compararam a dosagem de haptoglobina com a condição clínica auferida por médicos veterinários, determinando assim sua sensibilidade e especificidade. Concentrações séricas de haptoglobina aumentaram significativamente durante a primeira semana pós-parto, tanto em animais saudáveis quanto em doentes. Os autores encontraram resultados que mostraram baixa sensibilidade (muitos casos de animais com haptoglobina acima do limiar de corte, mas que não estavam doentes na avaliação clínica) e alta especificidade (poucos casos de animais com haptoglobina abaixo do limiar de corte, mas que se apresentaram doentes à avaliação clínica).

Quadros de estresse também poderiam acarretar na elevação da concentração sérica dessa proteína, visto que o estresse constitui uma síndrome que altera diversos parâmetros fisiológicos (SPORER et al., 2008; NDOU et al., 2011). Algumas das condições estressantes que induzem a elevação significativa da haptoglobina plasmática são o estado de ansiedade gerado pelo período pré-parto em vacas (ALSEMGEEST et al., 1993; HUZZEY et al., 2015) e restrições nutricionais em bezerros (KATOH et al.,

2002). Estudos realizados no período de desmame indicaram que o evento da apartação não altera a concentração de haptoglobina sanguínea nos bezerros (HICKEY et al., 2003).

4.5. Colostragem

Gomes et al. (2021) detalham que um programa de manejo de colostro bem-sucedido é baseado no princípio dos 3 Q's: quantidade, qualidade e quão rápido. O padrão ouro da qualidade está intrinsecamente ligado aos níveis de IgG, que devem ser ≥ 50 mg/mL, ou no índice de qualidade firmado no refratômetro Brix $\geq 25\%$. A quantidade e rapidez deve seguir 10% do peso corporal ao nascimento de colostro de alta qualidade na primeira refeição, por mamadeira ou sonda, em até duas horas de vida, e mais 5% do peso corporal na segunda mamada, sem forçar a ingestão, em até oito horas de vida.

Barrington & Parish (2001) relatam que, além das imunoglobulinas, células imunes como leucócitos e várias citocinas também são supridas aos neonatos através do colostro. Ingestão adequada de colostro também se mostra importante para a estimulação da capacidade absorptiva e digestiva da lactose no trato intestinal, o que pode ser parte da explicação da razão pela qual bezerras “mal colostradas” não crescem tão bem quanto as bezerras “bem colostradas”, mesmo em não ocorrência de doenças (HAMMON; BLUM, 1997).

O sucesso na transferência de imunidade passiva pode ser mensurado pela dosagem de proteína total ou de sólidos totais no soro sanguíneo, utilizando-se refratômetro de Brix ou de proteína total. O ideal é avaliar os bezerros entre 24 e 48 horas de vida (GOMES et al., 2021). Nylor & Kronfeld (1977) e Godden (2008) avaliaram correlação entre a medição de proteínas séricas totais (PST) e concentração de IgG's no sangue, como preditor de transferência de imunidade passiva, e concluíram que, para uma meta de > 10 g/L de IgG's, PST deve estar $> 5,2$ g/dL. Deelen et al. (2014) avaliaram a utilidade do refratômetro Brix, em comparação com as mensurações pelo refratômetro de dosagem de proteínas totais, para a determinação do sucesso na transferência de imunidade passiva. Quatrocentas amostras de sangue foram coletadas de bezerras holandesas entre 3 e 6 dias de idade. A combinação ótima para sensibilidade (88,9%) e especificidade (88,9%) foi o Brix em 8,4%. Proteínas séricas totais foram positivamente correlacionadas com % de Brix ($r = 1,00$).

4.6. Consumo de leite/sucedâneo lácteo, ganho de peso e eficiência alimentar

Kertz et al. (1998) afirmam que as taxas de crescimento, ou de ganho de peso, expressas como percentual de aumento no tamanho e/ou no peso, são maiores ao nascimento e declinam significativamente à medida que os animais crescem.

O *National Research Council* (NRC, 2001), estabeleceu requerimentos de energia para bezerras leiteiras com menos de 100 kg de peso vivo, em unidades de energia metabolizável (EM), que é determinada subtraindo-se da energia total ingerida, a energia perdida nas fezes, bem como em gás metano e na urina. Em bezerras jovens, a energia perdida em metano é insignificante e, portanto, ignorada (Holmes; Davey, 1976). Os requerimentos para EM para manutenção, sob condições de termoneutralidade, são aproximadamente 1,75 Mcal/d para uma bezerra de 45 kg de peso vivo. O leite integral contém, em média, 5,37 Mcal/kg de sólidos, o que significa, portanto, que uma bezerra de 45 kg deve consumir 325 g de sólidos de leite por dia, ou 2,5 L de leite integral, para garantir a sua manutenção (considerando leite integral com 13% de sólidos). Uma vez que a maior parte dos sucedâneos lácteos possuem menor teor de gordura do que leite integral, estes possuem também menos EM por unidade de sólidos (4,6 a 4,7 Mcal/kg). Conseqüentemente, uma bezerra de 45 kg vai requerer 380 g de sucedâneo lácteo (em torno de 3,0 L) somente para a sua manutenção. Quantidades de sólidos consumidos além do requerido para a manutenção, será o que a bezerra utilizará para o seu crescimento (Drackley, 2008).

Tabela 1: Requerimentos de energia metabolizável e proteína digestível aparente para uma bezerra de 50 kg em diferentes taxas de ganho de peso sob condições de termoneutralidade

Taxa de ganho (kg/d)	EM (Mcal/d)	PDA (g/d)	IMS requerida (kg/d) ^a	PB requerida (% MS) ^b
0,00	1,88	31	0,40	8,3
0,20	2,37	78	0,45	18,7
0,40	3,00	125	0,63	21,4
0,60	3,70	173	0,78	23,7
0,80	4,46	220	0,94	25,1
1,00	5,25	267	1,10	26,1

Abreviações: EM = energia metabolizável; PDA = proteína digestível aparente; IMS = ingestão de matéria seca; PB = proteína bruta

^a Quantidades de sucedâneo lácteo com 4,75 Mcal/kg MS necessárias para atingimento da EM requerida

^b Quantidades de proteína bruta necessárias na matéria seca do sucedâneo lácteo para suprir a quantidade de PDA coerente com a EM provida, via premissas e equações do NRC.

Dados do *National Research Council* (2001). Adaptado de Drackley (2008)

De acordo com Stamey et al. (2005), os sistemas modernos de aleitamento de bezerras têm preconizado volumes de dieta líquida bem maiores do que os outrora recomendados. Esses sistemas têm diversas denominações, tais como crescimento acelerado, nutrição melhorada, nutrição intensificada ou crescimento biológico apropriado. O padrão ouro seria, então, fornecer 1,5% do peso vivo, em sólidos no leite na primeira semana de vida, e depois 2% do peso vivo a partir da segunda semana até a desmama. Já o *National Academy of Sciences, Engineering and Medicine* (NRC, 2021) recomenda 0,107 Mcal por kg de peso metabólico para bezerras que se alimentam apenas de dieta líquida, ou 0,1138 Mcal por kg de peso metabólico para bezerras que se alimentam de dieta líquida e ração.

Dentre os benefícios de se incrementar o status nutricional dos animais nas primeiras 2 ou 3 semanas de vida estão o fato de as bezerras aumentarem a sua capacidade de enfrentar os diversos desafios infecciosos, alcançar peso à primeira inseminação mais cedo e, conseqüentemente, menor idade ao primeiro parto e maior produção de leite (DRACKLEY, 2005).

Coelho (2009) afirma que as metas na criação de bezerras devem ser minimizar incidência e ocorrência de doenças nos primeiros quatro meses de vida, dobrar o peso ao nascimento nos primeiros 56 dias de vida, atingir a puberdade e maturidade sexual precocemente (50% do peso adulto aos 13 meses), e ser economicamente viável.

Estima-se que, para o bom funcionamento do sistema imune, o animal apresente aumento da exigência nutricional de 20% a 40% da manutenção. Quantidades inadequadas de energia e proteína podem diminuir a imunidade celular, a produção de citocinas, o sistema complemento, a função fagocitária e as concentrações de anticorpos (SCHRAMA et al., 1993; DIAZ et al., 2001; DRACKLEY, 2008).

A restrição de dieta líquida resulta em considerável redução da eficiência de conversão alimentar em bezerras lactentes. Bezerras alimentadas com leite de forma *ad-libitum* apresentam eficiência alimentar de 0,75 a 0,80 g de ganho de peso para cada g de consumo de matéria seca (DIAZ et al., 2001; DRACKLEY, 2008).

Diaz et al. (2001) avaliaram ganhos de peso e eficiência alimentar em bezerros holandeses sob três diferentes tratamentos. Sessenta bezerros neonatos, com 45 ± 4 kg de peso vivo, foram divididos em três grupos. Os tratamentos foram delineados para obtenção de ganhos de 500, 950 e 1.400 g/d, respectivamente. Dezoito bezerros foram alocados em cada um dos três tratamentos. Os diferentes tratamentos foram: 1, 3 e 4% do peso vivo em consumo de matéria seca por dia de sucedâneo lácteo objetivando os ganhos diários. Tratamentos 1 e 2 tiveram seu sucedâneo reconstituído para 15% de matéria seca, enquanto tratamento 3 foi reconstituído para 18% de matéria seca. Nenhuma dieta sólida foi oferecida e os animais foram pesados duas vezes ao dia. Três diferentes pesos foram pré-determinados para abate dos animais, sendo seis bezerros abatidos, dentro de cada tratamento (avaliação da composição corporal) em cada peso objetivado (65, 85 e 105 kg PV). Bezerros no tratamento 3 obtiveram o menor consumo acumulado de matéria seca para cada um dos pesos de abate ($P < 0,05$). Tratamentos 1 e 2 superaram seus ganhos diários objetivados em 14 e 2,5%, respectivamente. Os ganhos médios nos tratamentos 1, 2 e 3 foram, respectivamente: 570, 970, $1.100 \pm 0,04$ g/d ($P = 0,003$). Tratamento 3 ficou 28,5% abaixo de seu ganho diário objetivado, possivelmente em função de uma incapacidade dos animais em consumirem a quantidade adequada de matéria seca, conforme pré-determinado, do nascimento até os 65 kg de peso vivo. Os animais do tratamento 3 atingiram o peso de 105 kg, 50 dias mais cedo que os animais do tratamento 1, e 14 dias mais cedo que os do tratamento 2. De maneira geral, a eficiência alimentar (ganho \div consumo) foi menor para bezerros no tratamento 1,

melhor no tratamento 2 e melhor ainda no tratamento 3 (0,57, 0,60, 0,75 \pm 0,03, respectivamente; $P < 0,05$). Entretanto, a eficiência alimentar decresceu para os animais do último peso de abate em todos os tratamentos.

Restrições em consumo de dieta líquida resultam em quedas significativas de eficiência alimentar em bezerras leiteiras, o que leva a menores diluições de custos de manutenção (GREENWOOD et al., 1998; HARREL, 1998; HODGE, 1974).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E. A.; BUCZINSKI, S. Short communication: ultrasonographic assessment of lung consolidation postweaning and survival to the first lactation in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. 99, 2, 1465-1470, 2016.

AGHAKESHMIRI, F. et al. Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent productive and reproductive performance of heifer calves. **Veterinary Research Communications**. 41, 2, 107-112, 2017.

AHMAD, A. et al. Beta glucan: A valuable functional ingredient in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 52, 201–212, 2012.

ALSEMGEEEST, S. P. M. et al. Concentrations of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **Veterinary Quarterly**, 16, 21–23, 1994.

ALSEMGEEEST, S. P. et al. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, 54, 164–167, 1993.

AOKI, S. et al. Oral administration of the β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* ameliorates development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Functional Foods**, 18, 22–27, 2015.

BACIC, A.; STONE, B. Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 8, 475–495, 1981.

BAI, J. et al. Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. **Trends in Food Science & Technology**, 88, 57–66, 2019.

BARAN, J. et al. Oral β -glucan adjuvant therapy converts nonprotective Th2 response to protective Th1 cell-mediated immune response in mammary tumor-bearing mice. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, 45, 2, 107-114, 2007.

BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 17, 3, 463-476, 2001.

BERESFORD, G.; STONE, B. A. (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan content of Triticum grains. **Journal of Cereal Science**, 1, 111-114, 1983.

BERNER, M. D. et al. IFN- γ primes macrophages for enhanced TNF- α expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate β -glucan. **Immunology Letters**, 98, 1, 115-122, 2005.

BLECHA, F.; BOYLES, S. L.; RILEY, J. G. Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahm \times Angus feeder calves. **Journal of Animal Science**, 59, 576-583, 1984.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, 28, 1, 3-14, 1995. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00076-3)

BROWN, G. D.; GORDON, A. S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, 19, 311-315, 2003.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal β -glucans. **Cellular Microbiology**, 7, 471-479, 2005.

BROWN, W. C.; RICE-FICHT, A. C.; ESTES, D. M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 63, 45-55, 1998.

BUCKERIDGE, M. S et al. Mixed linkage (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucans of grasses. **Cereal Chemistry**, 81, 115-127, 2004.

BURTON, J. L. et al. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. **Journal of Leukocyte Biology**, 57, 317-325, 1995.

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

CANOZZI, M. E. A. et al. Dehorning and welfare indicators in beef cattle: a meta-analysis. **Animal Production Science**, 59, 5, 801-814, 2019.

CHAE, B. J. et al. Effects of supplementation of β -glucan on the growth performance and immunity in broilers. **Research in Veterinary Science**. 80, 1, 291–298, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.07.008>

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. **Reproduction, Nutrition, Development**, 38, 3, 275–280, 1998.

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**, 145, 1, 5–26, 2008.

CHEN, C. et al. Ultrasound-assisted extraction from defatted oat (*Avena sativa* L.) bran to simultaneously enhance phenolic compounds and β -glucan contents: Compositional and kinetic studies. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.002>.

CHIHARA, G. International journal of oriental medicine. **Oriental Healing Arts Institute of U.S.A Press**, 2001.

COELHO, S. G. Desafio na criação e saúde de bezerras. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, Belo Horizonte. Anais..., 1-16, 2009.

COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-year review: Stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, 100, 12, 10367-10380, 2017.

CONNER, J. G. et al. Acute phase response and mastitis in the cow. **Research in Veterinary Science**, v. 41, n. 1, p. 126–128, 1986.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742-780, 1997.

CZOP, J. K. The Role of β -Glucan Receptors on Blood and Tissue Leukocytes in Phagocytosis and Metabolic Activation. The Year in Immunopathology. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 5, n. 3-5, p. 286-296, 1986.

DEELEN, S. M. et al. Evaluation of a brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, 97, 6, 3838-3844, 2014.

DENG, C. et al. Mechanism of the immunostimulatory activity by a polysaccharide from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 91, 752–759, 2016.

DOHERTY, T. J. et al. Effects of concentrated lidocaine solution on the acute phase stress response to dehorning in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, 90, 4232–4239, 2007. doi: 10.3168/jds.2007-0080

DIAZ, M. C. et al. Composition of growth of Holstein calves fed milk replacer from birth to 105-kilogram body weight. **Journal of Dairy Science**, 84, 830–42, 2001.

DILUZIO, N. R. Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defence mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, 4, 344 -347, 1983.

DRACKLEY, J. K. Early growth effects on subsequent health and performance of dairy heifers. **In: Garnsworthy PC, editor. Calf and heifer rearing. Nottingham (UK): Nottingham University Press, p. 213–35, 2005.**

DRACKLEY, J. K. Calf Nutrition from Birth to Breeding. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 24, 55–86, 2008.

DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: A review. **Phytotherapy Research: PTR**. 28, 159–166, 2014.

EATON, J. W. et al. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science**, v. 215, i. 4533, p. 691–693, 1982.

ECKERSALL, P. D. et al. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. **Advances in Veterinary Medicine**. 41, 643–655, 1999.

EICHER, S. D. et al. Yeast cell-wall products containing beta-glucan plus ascorbic acid affect neonatal *Bos taurus* calf leukocytes and growth after a transport stressor. **Journal of Animal Science**, 88, 1195–1203, 2010.

ELSON, E. C. Quantitative determination of serum haptoglobin. A simple and rapid method. **American Journal of Clinical Pathology**, 62, 655–663, 1974.

ESTREM, S. T.; SKATRUD, P. L. Old and new approaches used to identify gene products important for *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, ed. 6, p. 357-359, 2001.

FLEET, G. H. Diversity of the composition, structure and significance of yeast cell walls. **20th International Specialized Symposium on Yeasts: Yeast cell surfaces and membrane phenomena**, May 23-27, Smolenice, Slovak Republic, 1999.

FOMENKY, B. E. et al. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCMI-1079 and *Lactobacillus acidophilus* BT1386 on total lactobacilli population in the gastrointestinal tract and colon histomorphology of Holstein dairy calves. **Animal Feed Science and Technology**, 234, 151–161, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.019>

FRANCO MONTROYA, L. N. et al. β -Glucan-induced cortisol levels improve the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, 60, 197–204, 2017.

FRIZZO, L. S. et al. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Animal Feed Science and Technology**, 169, 147–156, 2011.

FRONTE, B. et al. 1,3- 1- 6 β - glucans enhance tissue regeneration in zebrafish (*Danio rerio*): Potential advantages for aquaculture applications. **Aquaculture Research**, 00, 1- 8, 2019. DOI: 10.1111/are.14270

FULLER, R. et al. Influence of yeast-derived 1,3/1,6 glucopolysaccharide on circulating cytokines and chemokines with respect to upper respiratory tract infections. **Nutrition**, 28, 665–669, 2012.

GALVÃO, K. N. et al. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 427–440, 2005.

GEBHARD, F. et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? **Arch Surg**, v. 135, n. 3, p. 291-295, 2000.

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

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19–39, 2008.

GOMES, V. et al. Doenças na fase de aleitamento e práticas de manejo sanitário na criação de bezerras. **Revista Brasileira de Buiatria, Clínica Médica**, v. 1, n. 2, p. 27-62, 2021.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunol. Rev.**, v. 230, p. 38–50, 2009.

GORDEN, P. J.; PLUMMER, P. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 243-259, 2010.

GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 30, p. 30-35, 2009.

GRAF, B.; SENN, M. Behavioural and physiological responses of calves dehorning by heat cauterization with or without local anaesthesia. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 62, p. 153–171, 1999. doi:10.1016/S0168-1591(98)00218-4

GREENWOOD, P. L. et al. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: I. Body growth and composition, and some aspects of energetic efficiency. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2354–2367, 1998.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 531-541, 1997.

HAHN, T. W. et al. Effects of supplementation of β -glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1422-1428, 2006.

HAMMON, H. M.; BLUM, J. W. Enhanced xylose absorption in neonatal calves by prolonged colostrum feeding. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2915–2919, 1997.

HAN, F. et al. Oral administration of yeast β -glucan ameliorates inflammation and intestinal barrier in dextran sodium sulfate-induced acute colitis. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 115–126, 2017.

HARREL, R. J. Ontogenic and nutritional regulation of the somatotropin/insulin-like growth factor system in growing pigs. **Ph.D. Dissertation Cornell University, Ithaca, NY**, 1998.

HE, Z. et al. Supplementing a yeast probiotic to pre-weaning Holstein calves: Feed intake, growth and fecal biomarkers of gut health. **Animal Feed Science and Technology**, v. 226, p. 81–87, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.010>.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, 1990.

HEINRICHS, A. J.; HEINRICHS, B. S. A prospective study of calf factors affecting first lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 336-341, 2011.

HEMATIAN, S. A.; KOOCHEKI, A.; ELAHI, M. Ultrasound-assisted extraction of β -D- glucan from hull-less barley: Assessment of physicochemical and functional properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 462–475, 2017.

HICKEY, M. C.; DRENNAN, M.; EARLEY, B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2847-2855, 2003.

HODGE, R. W. Efficiency of food conversion and body composition of the pre-ruminant lamb and the young pig. **British Journal of Nutrition**, v. 32, p. 113–126, 1974.

HOLMES, C. W.; DAVEY, A. W. F. The energy metabolism of Young Jersey and Friesian calves fed fresh milk. **Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 43–53, 1976.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 682–692, 2010.

HUBER, J. Pain management with flunixin meglumine at dehorning of calves. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 132–140, 2013. doi:10.3168/jds.2012-5483

HUMBLET, M. F. et al. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 2, p. 188-193, 2006.

HUZZEY, J. M. et al. Associations of peripartum markers of stress and inflammation with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 120, p. 291-297, 2015.

JELLMAYER, J. A. et al. Dectin-1 expression by macrophages and related antifungal mechanisms in a murine model of *Sporothrix schenckii* sensu stricto systemic infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 78–84, 2017.

KAO, P. F. et al. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta- 1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 12, p. 1–8, 673764, 2012.

KATO, M. et al. Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 9, n. 4, p. 293-298, 1997.

KATOH, N. et al. Decreases of apolipoprotein B-100 and A-I concentrations and induction of haptoglobin and serum amyloid A in nonfed calves. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 51–55, 2002.

KERTZ, A. F.; BARTON, B. A.; REUTZEL, L. R. Relative efficiencies of wither height and body weight increase from birth until first calving in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1479–1482, 1998.

KIDO, K. et al. Provision of beta-glucan prebiotics (cellooligosaccharides and kraft pulp) to calves from pre- to post- weaning period on pasture. **Animal Science Journal**, v. 90, p. 1537-1543, 2019.

KIRON, V. et al. Recognition of purified beta 1,3/1,6 glucan and molecular signalling in the intestine of Atlantic salmon. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 56, p. 57–66, 2016.

KOLLAR, R. et al. Architecture of the yeast cell wall - β (1-6) glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 28, p. 17762-17775, 1997.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v. 101, p. 229-241, 2001.

KURASH, J. K.; SHEN, C. N.; TOSH, D. Induction and regulation of acute phase proteins in transdifferentiated hepatocytes. **Experimental Cell Research**, v. 292, p. 342–358, 2004.

LANGFORD, F. M.; WEARY, D. M.; FISHER, L. Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 3963–3966, 2003.

LAURELL, C. B.; NYMAN, M. Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. **Blood**, v. 12, p. 493–506, 1957.

LESMEISTER, K. E.; HEINRICHS, A. J.; GABLER, M. T. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth

characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1832–1839, 2004.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, 127, 117-126, 2000.

LINN, J.; RAETH-KNIGHT, M. Yeast in dairy cattle diets. **Proceedings of the 2005 Four State Dairy Nutrition and Management Conference**. p. 85-90, 2005.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIU, J. et al. Feeding glycerol-enriched yeast culture improves performance, energy status, and heat shock protein gene expression of lactating Holstein cows under heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 6, p. 2494–2502, 2014.

LUND, A. Yeasts and moulds in the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, v. 81, n. 10, p. 453–462, 1974.

LUO, J. et al. Purified β -glucans of Different Molecular Weights Enhance Growth Performance of LPS-challenged Piglets via Improved Gut Barrier Function and Microbiota. **Animals**, v. 9, n. 602, p. 1-13, 2019. doi:10.3390/ani9090602

MAGALHÃES, V. J. A. et al. Effect of feeding yeast culture on performance, health and immunocompetence of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1497-1509, 2008.

MA, T. et al. Effects of dietary yeast β -glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, p. 749–757, 2015.

MAITY, P. et al. Structural, immunological, and antioxidant studies of β -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 350–358, 2015.

MCDONNELL, R. P. et al. Effect of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and/or β -glucans on performance, feeding behaviour and immune status of Holstein Friesian bull calves during the pre- and post-weaning periods. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2019.

MCINTOSH, M., STONE, B. A., STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 163–173, 2005.

MEIRA, D. A. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 55, n. 5, p. 496-503, 1996.

MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J. Interpretation of cortisol response in calf disbudding studies. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 45, p. 126–127, 1997. doi:10.1080/00480169.1997.36009

MILLER, R. J. et al.. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 194, p. 417-449, 2009.

MINATO, K. I. et al. Pleurotus citrinopileatus polysaccharide induces activation of human dendritic cells through multiple pathways. **International Immunopharmacology**, v. 40, p. 156–163, 2016.

MO, L. et al. Anti-tumor effects of (1→3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*. 95, 385–392, 2017.

MORAN, C. A. Functional components of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* applications for yeast glucan and mannan. In: Lyons, T. P.; Jaques, K. A. (Org.). **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries**. **Nottingham University Press**, 504, 2004.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, 168, 28–40, 2004.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, ENGINEERING AND MEDICINE. Nutrient requirements of dairy cattle, Washington, DC: The National Academy Press, 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th edition. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

NDOU, S. P.; MUCHENJE, V.; CHIMONYO, M. Animal welfare in multipurpose cattle production systems and its implications on beef quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1049–1064, 2011.

NYLOR, J. M.; KRONFELD, D. S. Refractometry as a measure of the immunoglobulin status of the newborn dairy calf: Comparison with zinc sulfate turbidity test and single radial immunodiffusion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 9, p. 1331–1334, 1977.

OBATA, H. et al. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 11, p. 816–822, 2006.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

OLSON, E. J. et al. Fungal β -Glucan Interacts with Vitronectin and Stimulates Tumor Necrosis Factor Alpha Release from Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3548–3554, 1996.

ORLEAN, P. Biogenesis of yeast wall and surface components. In: Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Vol 3 (J. Pringle, J. Broach and E. Jones, eds). **Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, 229–362, 1997.

PANNDORF, H.; RICHTER, H.; DITTRICH, B. Haptoglobin in domestic mammals. V. Plasma haptoglobin level in cattle under pathological conditions. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, v. 30, n. 2, p. 193–202, 1976.

PARK, K. M. et al. Composition for external application containing a β -1,6-branched- β -1,3-glucan. **US patent 0029253 A1**, 2001.

PARK, H.; KA, K. H.; RYU, S. R. Enhancement of β -glucan content in the cultivation of cauliflower mushroom (*Sparassis latifolia*) by elicitation. **Mycobiology**, v. 42, p. 41–45, 2014.

PEARCE, S. C. et al. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.

PERSSON WALLER, K.; GRONLUND, U.; JOHANNISSON, A. Intramammary Infusion of β 1,3-glucan for Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 50, p. 121–127, 2003.

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, p. 7, 2013.

PIVARCSI, A. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *International Immunology*, v. 15, n. 6, p. 721-730, 2003.

POPPY, G. D. et al. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 6027–41, 2012.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 13, p. 3-11, 2002.

RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 3, p. 268-273, 2002.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 73 (suppl.), p. 406-409, 2001.

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and liver disease**, Rome, v. 34, n. 2, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Rev.**, New York, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANDULA, J.; MACHOVA, E.; HRIBALOVA, V. Mitogenic activity of particulate yeast β (1-3)-D-glucan and its water-soluble derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 6, p. 323-326, 1995.

SCHRAMA, J. W. et al. Evidence of increasing thermal requirement in young, unadapted calves during 6 to 11 days of age. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1761–1766, 1993.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. et al. Physiological and behavioural changes in Holstein calves during and after dehorning and castration. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, p. 131–138, 2005. doi:10.4141/A04-051

SEVI, A. et al. Behavioral, adrenal, immune and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 642–652, 2001.

SHAVIT, Y.; FRIDEL, K.; BEILIN, B. Postoperative pain management and proinflammatory cytokines: animal and human studies. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 1, p. 443-451, 2006.

SINCLAIR, S. Understanding and managing the animal welfare impacts of dehorning in *Bos indicus* cattle. **PhD Thesis, The University of Queensland, Gatton, Australia**, 2012.

SKENDI, A. et al. Structure and rheological properties of water soluble β -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. **Journal of Cereal Science**, v. 38, p. 15–31, 2003.

SKINNER, J. G.; BROWN, R. A.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. **Veterinary Record**, v. 128, p. 147–149, 1991.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, EM: BEAULIEU P, LUSSIER D, Porreca F et al. – **Pharmacology of Pain**, 1st Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.

SPORER, K. R. B. et al. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1325–1334, 2008.

STAMEY, J. A.; JANOVICK GURETZKY, N. A.; DRACKLEY, J. K. Influence of starter protein content on growth of dairy calves in an enhanced early nutrition program. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 254, 2005.

STANTON, A.L. et al. The effect of respiratory disease and a preventative antibiotic treatment on growth, survival, age at first calving, and milk production of dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 4950-4960, 2012.

STILWELL, G. et al. Effects of hot-iron disbudding, using regional anaesthesia with and without carprofen, on cortisol and behaviour of calves. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 338–341, 2012. doi:10.1016/j.rvsc.2011.02.005

SVENSSON, C. et al. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf level risk factors for infectious diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 3-4, p. 179-197, 2003.

THIELGAARD-MONCH, K. et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. **Blood**, v. 108, p. 353–361, 2006.

THIELEN, M. A. et al. Qualitative detection of haptoglobin mRNA in bovine and human blood leukocytes and bovine milk somatic cells. **Veterinární Medicína**, v. 50, p. 515–520, 2005.

TOATES, F. M. Stress-Conceptual and Biological Aspects. Wiley, Chichester, 1995.

TONDOLFO, J. S. M. et al. Extraction, characterization and biological activity of a (1,3)(1,6)- β -D-glucan from the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 719–727, 2017.

UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811-815, 1999.

USDA. Dairy 2014, Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations, 2018.

VAIKOUSI, H.; BILIADERIS, C. G.; IZYDORCZYK, M. S. Solution flow behavior and gelling properties of water-soluble barley (1→3, 1→4)- β -glucans varying in molecular size. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 119–137, 2004.

VILLOT, C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 affects health, growth, and fecal microbiota in milk-fed veal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 7011–7025, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16149>

VIRTALA, A. M. K. et al. The effect of calfhood diseases on growth of female dairy calves during the first 3 months of life in New York State. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1040-1049, 1996.

WILLIAMS, D. L.; MUELLER, A.; BROWDER, W. Glucan-based macrophage stimulators - A review of their anti-infective potential. **Clinical Immunotherapy**, v. 5, p. 392–399, 1996.

WOOD, P. J.; FULCHER, R. G.; STONE, B.A. Studies on the specificity of interaction of cereal cell wall components with Congo Red and Calcofluor. Specific detection and histochemistry of (1→3), (1→4)-β-D-glucan. **Journal of Cereal Science**, v. 1, p. 95–110, 1983.

WOOD, P. R.; SEOW, H. F. T cell cytokines and disease prevention. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 54, p. 33–44, 1996.

WU, J. et al. Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 474–494, 2016.

YUAN, K. et al. Yeast product supplementation modulated feeding behavior and metabolism in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 1–9, 2015.

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**, n. 6, v. 4, p. 1–13, 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, n. 5, p. 3081–3098, 2014.

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

ZHU, F. M.; DU, B.; XU, B. J. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275–288, 2016.

SECOND SECTION - ARTICLE

Effect of glucan prebiotics on growth performance, milk replacer intake, health and immunity of dairy calves

Luiz Marcos Simões Filho¹, Bruno Gonzales², Marina A. N. Pereira³, Rayana B. Silva³, Elias Alves da Silva⁴, Rafaella Silva Andrade¹, Elaine M. S. Dorneles^{1*}, Alessandro de Sá Guimarães^{5*} and Marcos N. Pereira^{1,6*}

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG; ²Fazenda São Jorge, São Pedro/SP;

³Better Nature Research Center, Ijaci/MG; ⁴Qualis Biotec Consultoria em Biotecnologia LTDA, Brasília/DF; ⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Juiz de Fora/MG;

⁶Corresponding author: mpereira@ufla.br

*These authors contributed equally to the study

ABSTRACT

Fungi cell wall prebiotics may affect immunity, performance, and the response of dairy calves to management stressors, such as dehorning (**DEH**) and weaning (**WEA**). Objectives were to evaluate the effect of the same dosage of β -glucans from two fungi cell wall, non-commercial prebiotics on nursing Holstein female calves subjected to dehorning and weaning. Forty-five calves formed 15 blocks by birth sequence and received a treatment at random within block from birth to WEA. Treatments were: Control (**CTL**) or prebiotics 1 (**PRE1**) or 2 (**PRE2**). Dosages at 2 to 30, 31 to 60, and 61 to 75 days of age were: 3, 6, and 9 g/d for PRE1 and 5, 10, and 15 g/d for PRE2, respectively. Milk replacer with or without treatments was orally dosed to each calf once daily. Calves were individually housed and fed until 17.9 ± 2.2 days of age and then were group fed with an automatic feeder. Milk replacer intake (**MRI**), rectal temperature (**RT**), diseases, and treatment drugs were recorded daily. Body weight (**BW**) was measured at birth, DEH, and WEA. DEH was at 34.9 ± 3.2 and WEA at 75.1 ± 2.21 days of age. Blood serum samples were obtained on days -1, +1, +3, and +7 relative to the stressors. Significance was at $P \leq 0.05$ and trends at $P \leq 0.10$. There was no calf mortality during the experiment, but 100% of calves in a treatment had at least one event of $RT \geq 39.5^\circ\text{C}$ (**fever**), more than 50% had diarrhea, and more than 30% had pneumonia. There was no treatment effect on the first episode of diseases. The PRE1 increased the mean RT from 2 to 30 days (39.0 vs 38.9°C) and increased the frequency of days with fever (11.1 vs 7.0%) relative to CTL and PRE2. Prebiotics did

not affect the frequency of diseases neither disease treatment cost. From birth to DEH, there were trends for PRE1 to reduce BW gain relative to PRE2 (407 vs 499 g/d). There was no treatment effect on BW gain (529 g/d) and MRI (6.7 L/d) from birth to WEA. There was no treatment effect on blood TNF- α and IL-6 around DEH and WEA. Around DEH, there was no treatment effect on haptoglobin. On day -1 relative to DEH, the IL-1 β was higher on PRE1 than PRE2 and there was a trend for PRE1 to be higher than CTL. The PRE1 also tended to increase IL-1 β relative to PRE2 on day +7 after DEH and PRE1 tended to increase IL-4 on day +7 relative to PRE2. On days +1 and +3 after WEA, PRE2 tended to reduce haptoglobin relative to PRE1. There were trends for serum IL-1 β on day +1 after WEA to be lower on CTL and PRE2 than on PRE1 and on this same day there was a trend for PRE1 to increase IL-4 relative to PRE2. The increase in IL-4 and IL-1 β in response to PRE1 suggests that PRE2 was less inflammatory than PRE1. Under this calf management scenario, yeast prebiotics did not affect the incidence of fever, diarrhea, and pneumonia, disease treatment costs, BW gain, and milk replacer intake.

Key words: calves, dairy cattle, β -glucan, haptoglobin, immunity, yeast

INTRODUCTION

The growing concern on the development of antibiotic-resistant strains of microorganisms (Langford et al., 2003) and the relative low cost relative to conventional chemical drugs have justified the use of prebiotics for the control of diseases in production animals (Gustafson and Bowen, 1997). Fungi cell wall represents 15 to 30% of the dry weight of fungi cells with the main components being β (1,3) glucan, β (1,6) glucan, mannoproteins, and chitin (Kollar et al., 1997; Lipke and Ovalle, 1998). A major obstacle to the use of β -glucans is its low solubility in aqueous media. Purification of β -glucans, making them totally free of mannoproteins, enhanced solubility and optimized immune activity (Lee et al., 2001). The β -glucans can increase the host resistance to viral, bacterial, fungal and parasitic infections by non-specific immunomodulation (DiLuzio, 1983; Bohn and BeMiller, 1995). The β -glucans can improve macrophage activation, T-cell and reticuloendothelial system stimulations, activation of natural-killer cells, and of classical and alternative complement pathways (Czop, 1986).

Ma et al. (2015) investigated the effects of yeast β -glucans on nutrient digestibility and serum profile of pre-ruminant Holstein calves. They found that the

daily gain and the gain-to-feed ratio were increased by yeast β -glucans in calf starter, the response was dependent of dosage, and serum concentrations of IgG and IgM were increased. A meta-analysis has demonstrated the possible positive effect of bacterial probiotics added to milk on calf health and performance (Frizzo et al., 2011). Yeast fermentation products had a positive effect on diarrhea under commercial calf raising condition (Alugongo et al., 2017). Stressors, such as dehorning (**DEH**), weaning (**WEA**), changes in location, and vaccination, can affect the immune function of calves (Alsemgeest et al., 1993; Katoh et al., 2002; Huzzey et al., 2015). The positive action of prebiotics or probiotics on calf immune function may be more valuable when immune challenges are induced by management stressors.

The objective of this experiment was to evaluate the effects of two blends of prebiotics based on β -glucans extracts (**PRE1** and **PRE2**) on growth performance, milk replacer intake, diseases, and immune markers of female Holstein calves subjected to DEH and WEA. Our hypothesis was that β -glucans would improve growth performance and health in Holstein female calves of a commercial dairy farm.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in a 400 lactating-cow, Holstein herd, housed in a cross ventilated free-stall barn, in São Paulo state, Brazil (-22.567371368408203, -47.9677734375). Calves were born from January to March 2020, during the rainy-hot season of the year. Forty-five female calves formed 15 blocks of 3 calves based on birth sequence and were randomly allocated to a treatment, within block, from day 2 after birth to WEA on day 75. Changes in management practices and data collection during the experiment were always performed once per week for the 3 calves in the same block. Treatments were Control (**CTL**, no feed additive) or two prebiotic blends: PRE1, which was 90.6% dry matter (**DM**) and composition in DM was 67.0% β -glucans, 73.2% neutral detergent fiber (**NDF**), 16.2% crude protein (**CP**), 1.0% ether extract (**EE**), 2.1% ash, or PRE2, which was 94.5% DM and composition in DM was 42.9% β -glucans, 16.8% NDF, 35.6% CP, 1.4% EE, 8.0% ash. The concentrations of β -glucans in PRE1 and PRE2 were evaluated in duplicate samples per product with an exo-1,3- β -glucanase and β -glucosidase assay kit according to the manufacturer's instructions (Megazyme Ltd., Bray, Ireland). The β -glucan content of yeast and mushroom powder were used as standards. Samples were measured photometrically at 510 nm. The β -glucan content was determined by subtracting the α -glucan content from the total glucan

content. Treatments were diluted in 120 mL of milk replacer solution and were dosed (60 mL syringes) to each calf once per day at 1200 h. Calves on CTL received 120 mL of pure milk replacer. The dosage of each prebiotic blend pretended to supply equivalent amounts of β -glucans. Three dosages were planned from birth to 30 days of age, 31 to 60 days, and 61 days to WEA at 75 days. The concentrations of β -glucans in each prebiotic and the daily dosages of treatments are shown in Table 1.

Pregnant multiparous cows in the last 30 days of gestation were housed in a cross-ventilated free stall barn and had continuous access to an adjacent area without stalls and with replaceable shavings bedding. The maternity barn was monitored by farm personal 24 hours per day. The calf was separated from the dam immediately after birth and was placed in individual pens (1.0 \times 1.5 m) with hay bedding until colostrum feeding. Calves were fed 4 L of fresh colostrum within 6 hours of life plus 2 L 12 h after birth. The brix of the colostrum was checked using a digital refractometer (PAL-1. Atago Brazil, Ribeirão Preto, Brazil) and, if needed, artificial colostrum (Alta Genetics, Uberaba, Brazil) would be added to achieve 27% brix (Figure 1). None of the colostrum obtained required the addition of artificial colostrum to achieve the desired brix. The brix of blood serum of the calves was measured 24 h after birth on samples obtained, by the farm veterinarian, from the jugular vein (Figure 1). Navel healing was performed with a 10% iodine solution 3 \times /d for 5 consecutive days. Body weight was measured with a precision scale (ICS-200. Coimma, Dracena, Brazil) immediately after the first colostrum feeding, at DEH, and at WEA.

During the first 17.9 ± 2.18 days of age (mean \pm SD), calves were individually housed and allowed to nurse up to 15 L/d of milk replacer from 5 L teat buckets (Peach Teats. Eurolatte, Cachoeirinha, Brazil). The milk replacer (Kalvolac Quick. Nutrifeed Friesland, Ameersfort, Netherlands) was prepared (146 g of powder/L of water) and fed 3 \times /d at 06:00, 12:00, and 19:00 h. The milk replacer contained (% of DM): 17% ether extract, 22% crude protein, 44% lactose, and 4.6 Mcal/kg of solids. After this period, calves formed groups of 16 to 18 and were housed in compost-bedded pack pens (20 \times 19 m) and were fed by an automatic milk feeder (Calf Feeder 150X. DeLaval, Jaguariúna, Brazil). The feeder was set for a daily allowance of milk replacer ranging from 8 L to a gradual increase to 12 L/d within 10 days in the feeder and then a gradual decay to 5 L/d starting at 40 days of age. At 63.2 ± 2.96 days of age (mean \pm SD), the transition to WEA started by moving calves to pens without automatic milk feeders. During this period, calves were fed 5 L/d of milk replacer with teat buckets 2 \times /d until

WEA (75.1 ± 2.21 days). The volume consumed of milk replacer was recorded. Calves were maintained in the same pen after WEA. Calves had continuous *ad libitum* access to water and to a pelleted calf starter (20% CP in as-fed basis. GuabiTech Rumileite. Guabi Nutrição Animal, Campinas, Brazil) during the entire experimental period. The intake of solid feed was not recorded.

Rectal temperature was measured daily at 0700 h using a digital thermometer (Th150. G-Tech Accumed-Glicomed, Duque de Caxias, Brazil). Fever was defined as rectal temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$ and a new event when it happened 1 day apart from the previous event. Health disorders were diagnosed daily by a veterinarian continuously present at the farm. Watery feces were defined as diarrhea and a new event when it happened 2 days apart from the previous event. Pneumonia was the association of increased respiratory frequency, cough, and nasal discharge, new events were 5 days apart. Babesiosis and anaplasmosis was jaundice, anemia, prostration, tachycardia, and hyperthermia.

Sick calves were treated according to the herd's veterinarian protocols. Treatments were recorded for each calf (drug, dosage, duration). Costs associated with health treatments were calculated based on current cost and drug usage. Costs per mL were: R\$ 0.85 flunixin meglumine, R\$ 1.03 enrofloxacin, R\$ 2.36 florfenicol, R\$ 0.14 dexamethasone, R\$ 1.46 meloxicam, R\$ 0.40 oxytetracycline, R\$ 0.64 diminazene and fhenazone, R\$ 2.01 cefquinone sulfate, R\$ 4.56 thymylosine, R\$ 0.96 penicilin, streptomycin and sodium diclofenac, and R\$ 0.44 bromhexine.

At approximately 5 weeks of age (34.9 ± 3.2 days), calves on the same experimental block were dehorned by the farm veterinarian under local anesthesia (5 mL of 2% lidocaine/horn). The cornual bud was removed with a scalpel and the bleeding was cauterized with heat from an electrical dehorner (Mochador. Polite Polímeros e Tecnologia, Marília, Brazil). Ointment was applied as a fly repellent after the surgical procedure. Plasma samples were obtained from the jugular vein on days -1, +1, +3, and +7 relative to the day of dehorning and to the day of weaning for the evaluation of blood immune markers. The blood markers evaluated were haptoglobin and the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-4, and TNF- α . The ELISA sandwich tests were performed using Bovine IL-1 β (ESS0027), Bovine IL-4 (ESS0031), Bovine IL-6 (ESS00290), and Bovine TNF- α (EBTNF) kits from Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), according to manufacturer's recommendations. Nunc Maxisorp (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) polystyrene 96-well plates were

used. Absorbance was measured at 450 nm and 550 nm (Epoch. BioTek, Winooski, USA). Serum haptoglobin concentration was analyzed by a colorimetric peroxidase activity assay (Cooke and Arthington, 2013) in a commercial laboratory (Laboratório Vidavet, Botucatu, Brazil).

Statistical analysis

Data were analyzed with PROC MIXED of SAS (Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A $P \leq 0.05$ was interpreted as statistically significant, a $0.05 < P \leq 0.10$ as a trend, and a $0.10 < P \leq 0.15$ as a weak trend. All treatment means were compared by pair-wise T-tests.

The most complete model, used for variables obtained over time, had the continuous covariate effect (measure of the same variable before treatment allocation), the random effect of block (1 to 15), and the fixed effects of treatment, time, and the interaction between treatment and time. Calf nested within treatment was defined as random. For each variable, the best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order autoregressive and compound symmetry. Degrees of freedom were calculated using the Kenward–Roger option. Reduced models were used for variables evaluated only once during the experiment or for variables without the covariate adjustment. It was done by removing the covariate, time, and its interaction with treatment from the previous model. Treatment means were compared by pairwise t-tests and the slice option was used to compare treatments within sampling time.

Frequency analysis was performed with PROC GENMOD using logistic regression for binomial data. The first event of fever, diarrhea, and pneumonia were analyzed with PROC LIFETEST and survival curves were generated.

Data on cytokines and haptoglobin were tested for normality and variance and were analyzed as nonparametric data. Comparisons among sampling days following dehorning or weaning were performed with the Friedman test. Treatment comparisons within the same sampling day were performed with the Kruskal-Wallis test. Both procedures were followed by Dunns's multiple comparison test (Graphpad Prism 8.1, Graphpad Software, USA).

RESULTS

The brix of the colostrum was greater than 27% for all samples and the brix of blood serum 24 hours after birth was greater than 8.6% for all calves (Figure 1). There

was no calf mortality during the experiment. However, 100% of calves had at least 1 event of rectal temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$, more than 50% of the calves on a treatment had at least 1 event of diarrhea, and more than 30% of calves on a treatment had at least 1 event of pneumonia (Figure 2).

Rectal temperature was highest during the first week of life, was moderate from 2 to 9 weeks of age, and was lowest at the end of the nursing phase (Figure 3). The treatment PRE1 increased the mean rectal temperature from birth to 30 days of age relative to CTL and PRE2 (Table 2), especially during week 4 (Table 3). During week 4, there was a trend ($P = 0.08$) for PRE2 to increase mean rectal temperature relative to CTL (Table 3). Treatment PRE1 increased the frequency of days from birth to 30 days of age with rectal temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$. The frequency of fever did not differ from 31 to 60 days of age and from 61 to 75 days of age, except for a weak trend ($P = 0.14$) for PRE1 to increase the frequency of fever from 31 to 60 days of age relative to CTL (Table 4). Prebiotics did not affect the frequency of diseases (Table 4) neither disease treatment costs (Table 5).

During week 4 of age, milk replacer intake was reduced by PRE1 (Table 6, Figure 4), with the highest rectal temperature observed for this treatment during this same week (Table 3). There was a weak trend ($P = 0.13$) for PRE1 to reduce milk replacer intake from birth to dehorning relative to PRE2 (6.8 vs 7.1 L/day) (Table 7). There were trends ($P \leq 0.10$) for PRE1 to reduce body weight and covariate adjusted body weight at DEH relative to PRE2 (Table 7). Body weight gain (499 vs 407 g/d) and feed efficiency (0.48 vs 0.40 g weight gain/g milk replacer solids) from birth to DEH tended ($P \leq 0.10$) to be reduced by PRE1 relative to PRE2. There was no treatment effect on body weight gain, milk replacer intake, and feed efficiency from birth to WEA (Table 7).

Regarding immunity markers, WEA induced a more acute and accentuated increase in serum haptoglobin concentration than DEH (Figures 5A and 5B). Treatments had no effect on haptoglobin concentration around DEH (Figure 6A). Treatment PRE2 tended ($P \leq 0.08$) to reduce haptoglobin on days 1 and 3 after WEA relative to PRE1, but there was a weak trend ($P = 0.13$) for PRE2 to increase haptoglobin relative to PRE1 on day -1 (Figure 6B). There were no differences around WEA in haptoglobin concentration between both prebiotics and CTL (Figures 6A and 6B). The PRE2 treatment reduced this acute phase protein relative to PRE1 after WEA.

The serum concentration of cytokine IL-1 β was increased by DEH and by WEA (Figures 5C and 5D). Around DEH, IL-1 β on day -1 was lower on PRE2 than PRE1 and tended to be lower on PRE2 than CTL (Figure 6C). The PRE2 also tended ($P = 0.08$) to reduce IL-1 β relative to PRE1 on day 7 (Figure 6C). There were trends ($P < 0.10$) for serum IL-1 β on day 1 after WEA to be lower on CTL and PRE2 than PRE1 (Figure 6D).

The IL-4 was higher on day 3 than on days 1 and 7 relative to DEH and did not vary around WEA (Figures 5E and 5F). The PRE1 tended ($P = 0.10$) to increase IL-4 on day 7 after DEH relative to PRE2 (Figure 6E). A weak trend ($P = 0.15$) for increased IL-4 on PRE1 than PRE2 also occurred on day 3 after DEH. There was a trend ($P = 0.10$) for PRE1 to increase IL-4 relative to PRE2 on day 1 after WEA (Figure 6F).

The cytokine TNF- α was increased only on day 1 after DEH and did not vary around WEA (Figures 5G and 5H). There was no treatment effect on serum TNF- α concentration (Figures 6G and 6H).

Serum IL-6 concentration was lowest on day 3 after DEH and was lower on day 7 relative to day 1 (Figure 5I). The DEH stressor reduced IL-6. This cytokine did not change in response to WEA (Figure 5J). There was no treatment effect on serum IL-6 concentration (Figures 6I and 6J).

DISCUSSION

The prebiotic blend PRE1 had 67.0 % β -glucans in DM and PRE2 had 42.9% β -glucans in DM. The dosages (g/d) of β -glucans were similar between treatments. Calves on PRE2 received only 7% more β -glucans per day than calves on PRE1 and intake of β -glucans per kg of body weight was the same (Table 1). In order to achieve the same β -glucan dosage, calves on PRE2 were supplemented with more prebiotic blend per day than calves on PRE1. The daily intake of β -glucans ranged from 2.0 to 6.4 g/d and the intake of prebiotic blend ranged from 3 to 15 g/d, depending on calf age and product. Ma et al. (2015) supplemented 75 mg of β -glucan (83% purity) per kg of milk replacer DM and observed positive effects in dairy calves. Eicher et al. (2010) evaluated 4 g/d and 0.21 g/d of β -glucans. Dosages of β -glucans for calves have not been precisely defined (Ma et al., 2015). The dosage of β -glucans in our experiment (2 to 6 g/d) seems to be a high dosage, based on literature.

Treatments had no major effects on growth performance and health, although they induced changes in blood biomarkers. Differently from our results, Ma et al.

(2015) found that the supplementation of yeast β -glucans improved the average daily gain (ADG) of calves. Other studies showed that the supplementation of β -glucans increased (McKee et al., 2000) or had no effect (Eicher et al., 2010) on the ADG. These inconsistencies might indicate that the properties (source, purity or solubility) and the dosage of β -glucans used, or the experimental conditions (normal or stressful) could influence the effect of β -glucans on ADG.

The calves in this experiment consumed around 970 g/d of milk replacer DM. According to the predictions of Drackley (2008), this amount of milk replacer would be sufficient for an ADG of at least 800 g/d. However, daily gain was 533 g/d on CTL, 497 g/d on PRE1, and 556 g/d on PRE2, much lower than the predicted (Drackley, 2008). This observation suggests that the calf raising sector of the farm was not obtaining good growth performance. The herd was also going through a sanitary challenge. Even though colostrum management was adequate and there were no calf deaths during the experiment, 100% of the calves had at least one case of fever, over 50% had diarrhea, and over 30% had pneumonia. The incidence of diseases was high compared to what would be obtainable in Holstein herds (Urie et al.; 2018). The experiment was conducted during the hot-rainy season of Southeast Brazil and the farm was having hired labor issues during the experiment, as may happen in any commercial dairy farm. The low ratio of ADG to daily milk replacer intake and the high incidence of health disorders suggest that calves were under sanitary and metabolic challenge. Under this scenario, our data suggest that there was no β -glucans effect on the incidence of diseases.

During the entire experiment, plasma haptoglobin concentration (media > 1 mg/mL) was apparently high according to published bovine standards (Skinner et al., 1991; Eckersall et al., 1999). We also observed that haptoglobin was increased more by WEA than by DEH, suggesting that the DEH procedure was less stressful to those calves than the WEA procedure. No evident effect of DEH on rectal temperature and milk replacer intake were observed (Figures 3 and 4). The cytokine IL-1 β , similarly to haptoglobin, was also affected by both DEH and WEA, but IL-4, TNF- α , and IL-6 were affected only by DEH, and did not vary around WEA.

Sporer et al. (2008) and Ndou et al. (2011) reported that although high levels of blood haptoglobin are reliable indicators of the occurrence of infectious or inflammatory processes in ruminants, stress could also lead to an increase in this acute phase protein. The changes in haptoglobin profile are suggestive that although stressors,

such as DEH and WEA, can affect serum haptoglobin concentration, this marker of immune function was not sensitive to β -glucans supplementation. Yun et al. (2014) asserted that innate immune conditions of calves are stimulated by weaning stress, resulting in an increase in the expression of acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. McDonnell et al. (2019) found significantly higher haptoglobin in the haematology of β -glucans supplemented calves. Kim et al. (2011) also reported increased levels of serum haptoglobin in calves supplemented with hydrolysed yeast containing β -glucans following a vaccine challenge.

There were trends for cytokine IL-1 to increase after both DEH and WEA. Goshen & Yirmiya (2009) stated that the pro-inflammatory cytokine IL-1, produced after exposure to immunological and physiological challenges, plays an important role in the neuroendocrine response of hormone production related to stress-related behaviors. The IL-1 is the first cytokine to be associated with modulation of the neuroendocrine system, particularly of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. IL-1 is therefore a critical mediator of adaptive stress responses. As it can be seen in figure 5D, IL-1 β increased significantly in day 1 after weaning, which can be assumed as an effect derived from the stress condition linked to this event. Stress can be defined as a physiological and behavioural state which is brought about by stress hormones and enables the organism to endure, avoid or recover from an aversive condition (Martin, 2009). The inflammatory response is initiated early on in order to remove the source of disturbance, to enable the organism to adapt the new conditions, and finally to restore homeostasis (Martin, 2009). Various studies have shown that stress can affect the immune function (O'Loughlin et al., 2011; Salak-Johnson and McGlone, 2007; O'Loughlin et al., 2012; Carroll et al., 2014). The effect of dehorning on TNF- α agrees with the known response of this cytokine to tissue damage (Oliveira et al., 2011). This cytokine is one of the earliest and most potent mediators of the inflammatory response after a surgical procedure, trauma or even during infections, being a good marker for surgical procedures. The IL-6 and IL-4 cytokines, although both varied after DEH, presented no conclusive data concerning the immunological status of calves on stressor events. Because mainly of what was observed in haptoglobin and IL-1 β , it is reasonable to believe that weaning was more stressful for the calves than dehorning.

The PRE2 prebiotic was apparently less inflammatory than PRE1, based on the trends for reductions on haptoglobin (Figure 6B), IL-1 β (Figures 6C and 6D), and IL-4 (Figures 6E and 6F). This condition may explain better performance of PRE2 animals in

contrast to the PRE1 ones, especially during the very beginning of calves lives (birth to DEH). Haptoglobin has a sharp and rapid response to inflammatory conditions (Nicholson et al., 2000). According to Hotamisligil (2006), the long-term consequences of prolonged inflammation status are often not beneficial. Inflammatory conditions are likely the results of pro-inflammatory cytokine release (Grimble, 1990). The cytokines induce immune stress and associated metabolic diversions from the normal patterns of nutrient channeling to increase heat production (fever) and synthesis of unusual proteins in liver and immune system tissues (Elsasser et al., 2000). According to Goodridge et al. (2009) individual fungi contain specific β -glucans, which differ from each other by the amount of (1-6) linked side chains. Moreover, the content and proportions of β -glucans in fungi is mainly determined by their genetic profile and differs between species and even cultivars. Upon ingestion, fungal glucans affect the mucosal immune system in the gastrointestinal tract. Similar to antigens, the uptake of β -glucans occur via M cells localized within the Peyer's patches in the small intestine. M cells subsequently present the antigen or β -glucan at their basal surfaces to immune cells, such as macrophages and dendritic cells. Here, β -glucans particles bind with microphages with the help of dectin-1, the primary receptor for most insoluble β -glucans. Subsequently, dectin-1 induces the secretion of pro-inflammatory cytokines via nuclear factor kappa-B, and various interconnected inflammatory and immunoregulatory processes such chemokinesis and chemotaxis. Based on our data, the effect on inflammation of two yeast derived prebiotics supplemented on an iso- β -glucan basis differed, this should be considered when designing prebiotic products to be used in practice.

CONCLUSIONS

The farm was apparently under a disease challenge during the experiment. Under this calf management scenario, β -glucan did not affect the incidence of fever, diarrhea, and pneumonia, disease treatment costs, body weight gain, milk replacer intake, and feed efficiency. Relative to PRE2, prebiotic PRE1 increased rectal temperature and reduced milk replacer intake and weight gain in early calf life and increased inflammation markers (Haptoglobin, IL-1 β , IL-4), suggesting that the effect of yeast based prebiotics in calves is product-dependent or dose-dependent. Biomarkers of immune function were affected differently by dehorning and weaning. Weaning was apparently more stressful than dehorning in this commercial dairy herd.

REFERENCES

Alsemgeest, S.P., Taverne, M.A., Boosman, R., van der Weyden, B.C., Gruys, E., 1993. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 164–167.

Alugongo, G.M., Xiao, J.X., Chung, Y.H., Dong, S.Z., Li, S.L., Yoon, I., Wu, Z.H., Cao, Z.J., 2017. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of Dairy Science*, 100, 2, 1189-1199.

Bohn, J.A., BeMiller, J.N., 1995. (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*. 28, 1, 3-14. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00076-3)

Carroll, J.A., Burdick Sanchez, N.C., Bill, E., 2014. Kunkle interdisciplinary beef symposium: overlapping physiological responses and endocrine biomarkers that are indicative of stress responsiveness and immune function in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 92, 5311–5318.

Cooke, R.F., Arthington, J.D., 2013. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA or a colorimetric method based on peroxidase activity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 531-536. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01298.x>

Czop, J.K., 1986. The Role of β -Glucan Receptors on Blood and Tissue Leukocytes in Phagocytosis and Metabolic Activation. *The Year in Immunopathology. Pathol. Immunopathol. Res.* 5, 286-296.

DiLuzio, N. R., 1983. Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defence mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 4, 344 -347.

Drackley, J.K., 2008. Calf Nutrition from Birth to Breeding. *Vet Clin Food Anim.* 24, 55–86.

Eckersall, P.D., Duthie, S., Toussaint, M.J.M., Gruys, E., Heegaard, P., Alava, M., Lipperheide, C., Madec, F., 1999. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Advances in Veterinary Medicine.* 41, 643–655.

Eicher, S.D., Wesley, I.V., Sharma, V.K., Johnson, T. R., 2010. Yeast cell-wall products containing beta-glucan plus ascorbic acid affect neonatal *Bos taurus* calf

leukocytes and growth after a transport stressor. *Journal of Animal Science*. 88, 1195–1203.

Elsasser, T.H., Klasing, K.C., Filipov, N., Thompson, F. 2000. The metabolic consequences of stress: Targets for stress and priorities of nutrient use. Pages 77–110 in *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal warfare*. G. P. Moberg and J. A. Mench, ed. CABI Publishing, New York, NY.

Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Signorini, M.L., 2011. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 147-156.

Goodridge, H.S.; Wolf, A.J.; Underhill, D.M. 2009. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.*, 230, 38–50.

Goshen, I., Yirmiya, R., 2009. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 30, 30-35.

Grimble, R.F., 1990. Nutrition and cytokine action. *Nutrition Research Review*, 3, 193-210.

Gustafson, R.H., Bowen, R.E., 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*. 83, 531-541.

Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 14, 860-867. Doi:10.1038/nature05485

Huzzey, J.M., Mann, S., Nydam, D.V., Grant, R.J., Overton, T.R. 2015. Associations of peripartum markers of stress and inflammation with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 120, 291-297.

Katoh, N., Oikawa, S., Oohashi, T., Takahashi, Y., Itoh, F. 2002. Decreases of apolipoprotein B-100 and A-I concentrations and induction of haptoglobin and serum amyloid A in nonfed calves. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 51–55.

Kim, M.H., Seo, J.K., Yun, C.H., Kang, S.J., Ko, J.Y., Ha, J.K., 2011. Effects of hydrolyzed yeast supplementation in calf starter on immune responses to vaccine challenge in neonatal calves. *Animal*. 5, 953–960.

Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E., 1997. Architecture of the yeast cell wall - β (1-6) glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272, 28, 17762-17775.

Langford, F.M., Weary, D.M., Fisher, L., 2003. Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. *J. Dairy Sci.* 86, 3963–3966.

Lee, J.N., Lee, D.Y., Ji, I.H., Kim, G.E., Kim, H.N., Sohn, J., Kim, S., Kim, C.H., 2001. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 4, 837-841.

Lipke, P.N., Ovalle, R., 1998. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180, 15, 3735-3740.

Ma, T., Tu, Y., Zhang, N.F., Guo, J.P., Deng, K.D., Zhou, Y., et al., 2015. Effects of dietary yeast β -glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 749–757.

Martin, L.B., 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen Comp Endocrinol*, 163, 70-76.

McDonnel, R.P., O'Doherty, J.V., Earley, B., Clarke, A.M., Kenny, D.A., 2019. Effect of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and/or β -glucans on performance, feeding behavior and immune status of Holstein Friesian bull calves during the pre-and post-weaning periods. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 7, 1-17.

McKee, C.A., Eicher, S.D., Johnson, T.R., 2000. Ascorbic acid and a beta-glucan product from *Saccharomyces cerevisiae* influence on dairy calf well-being. *Journal of Dairy Science*, 83, 1, 134.

Ndou, S.P., Muchenje, V., Chimonyo, M. 2011. Animal welfare in multipurpose cattle production systems and its implications on beef quality. *African Journal of Biotechnology*, 10, 1049–1064.

Nicholson, J.P., Wolmarans, M.R., Park, G.R., 2000. The role of albumin in critical illness. *British Journal of Anaesthesiology*, 85, 599-610.

Oliveira, C.M.B., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L.R., Salomão, R., 2011. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61, 2, 255-265.

O'Loughlin, A., Lynn, D., McGee, M., Doyle, S., McCabe, M., Earley, B., 2012. Transcriptomic analysis of the stress response to weaning at housing in bovine leukocytes using RNA-seq technology. *BMC Genomics*, 13, 250.

O'Loughlin, A., McGee, M., Waters, S., Doyle, S., Earley, B., 2011. Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. *BMC Vet Res.*, 7, 45.

Salak-Johnson, J.L., McGlone, J.J., 2007. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science*, 85, E81–88.

Skinner, J.G., Brown, R.A., Roberts, L., 1991. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Veterinary Record*, 128, 147–149.

Sporer, K.R.B., Weber, P.S.D., Burton, J.L., Earley, B., Crowe, M.A. 2008. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *Journal of Animal Science*, 86, 1325–1334.

Urie, N.J., Lombard, J.E., Shivley, C.B., Koprak, C.A., Adams, A.E., Earleywine, T.J., Olson, J.D., Garry, F.B., 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *Journal of Dairy Science*, 101, 10, 9229-9244.

Yun, C.H., Wynn, P., Ha, J.K., 2014. Stress, acute phase proteins and immune modulation in calves. *Anim Prod Sci.* 54, 1561–1568.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Daily dosages of prebiotic blends PRE1 and PRE2 during the nursing phase.

Days of age	PRE1	PRE2
	g/calf/day	
2 - 30	3	5
31 - 60	6	10
61 - 75	9	15
	β -glucans, g/calf/day	
2 - 30	2.01	2.14
31 - 60	4.02	4.29
61 - 75	6.03	6.43
	β -glucans, g/kg of BW/day	
2 - 30	0.04	0.04
31 - 60	0.06	0.06
61 - 75	0.08	0.08

Table 2. Rectal temperature in periods of the nursing period (Days of age) and days of rectal temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$ (Fever) from birth to weaning. Data obtained daily.

Item	Treatments ¹				<i>P</i> -value					
	CTL	PRE1	PRE2	SEM ²	Treat	Day	Treat×Day	CTL vs. PRE1	CTL vs. PRE2	PRE1 vs. PRE2
	$^{\circ}\text{C}$									
1 - 30	38.9	39.0	38.9	0.04	0.04	< 0.01	0.79	0.02	0.76	0.04
31 - 60	38.8	38.8	38.7	0.05	0.16	< 0.01	0.71	0.20	0.57	0.06
61 - 75	38.6	38.5	38.7	0.07	0.29	0.73	0.88	0.30	0.62	0.13
Fever, days/calf	6.5	8.4	6.3	1.08	0.61			0.51	0.76	0.34

¹Treatments = Control (CTL) and prebiotics PRE1 and PRE2.

²SEM = Standard error of the means.

Table 3. Rectal temperature during weeks of the nursing period.

Weeks	Treatments ¹				P-value			
	CTL	PRE1	PRE2	SEM ²	Treat	CTL vs. PRE1	CTL vs. PRE2	PRE1 vs. PRE2
	°C							
1	39.1	39.1	39.0	0.07	0.30	0.90	0.16	0.20
2	38.9	39.0	38.9	0.05	0.83	0.56	0.87	0.67
3	38.8	38.8	38.8	0.05	0.93	0.70	0.86	0.83
4	38.8	39.0	38.9	0.07	0.02	< 0.01	0.08	0.24
5	38.9	38.9	38.8	0.08	0.44	0.62	0.43	0.20
6	38.1	39.1	38.9	0.09	0.21	0.13	0.97	0.12
7	38.9	38.9	38.9	0.10	0.84	0.83	0.57	0.72
8	38.5	38.7	38.6	0.09	0.25	0.11	0.60	0.26
9	38.6	38.5	38.6	0.10	0.89	0.65	0.93	0.71
10	38.6	38.5	38.7	0.11	0.56	0.74	0.48	0.30
11	38.7	38.6	38.7	0.11	0.85	0.57	0.75	0.80
1 to 11 ³	38.8	38.8	38.8	0.04	0.59	0.37	0.98	0.38

¹Treatments = Control (CTL) and prebiotics PRE1 and PRE2.

²SEM = Standard error of the means.

³Repeated measures approach: $P < 0.01$ for the fixed effect of week (1 to 11) and $P = 0.61$ for the interaction of treatment and week.

Table 4. Proportion (%) of days with rectal temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$ (Fever) in periods of the nursing period (Days of age), and health disorders during the 75-d nursing period.

Item	Treatments ¹			CTL vs. PRE1 ²			CTL vs. PRE2 ²			PRE1 vs. PRE2 ³						
	CTL	PRE1	PRE2	AOR ⁴	95% CI ⁵	<i>P</i>	AOR	95% CI	<i>P</i>	AOR	95% CI	<i>P</i>				
Fever																
1 - 30	7.1	11.1	6.9	0.5	0.03	0.95	0.04	-0.03	-0.55	0.48	0.90	0.5	0.06	0.99	0.03	
31 - 60	8.2	11.1	8.7	0.3	-0.11	0.78	0.14	0.06	-0.41	0.53	0.81	-0.3	-0.72	0.16	0.22	
61 – 75	11.1	8.2	11.1	-0.3	-0.97	0.30	0.30	0.0	-0.58	-0.58	0.99	0.3	-0.30	0.97	0.30	
1 – 75	8.4	10.5	8.4	0.3	-0.03	0.54	0.08	0.01	-0.29	0.30	0.94	-0.2	-0.53	0.04	0.09	
Diarrhea ⁶	60.0	53.3	73.3	0.3	-1.17	1.72	0.72	0.6	-0.93	2.15	0.44	0.9	-0.65	2.41	0.26	
Pneumonia ⁶	53.3	53.3	33.3	0.0	-1.43	1.43	0.99	-0.8	-2.30	0.65	0.27	-0.8	-2.30	0.65	0.27	
Babesiosis/Anaplasmosis ⁶	6.6	6.6	20.0	0.0	-2.86	2.86	0.99	1.2	-1.13	3.64	0.30	1.2	-1.13	3.64	0.30	
Health disorders ⁶	86.0	73.0	73.0	-0.9	-2.74	1.01	0.36	-0.9	-2.74	1.01	0.36	0.0	-1.62	1.62	0.99	

¹Treatments = Control (CTL) and prebiotics PRE1 and PRE2.

²CTL is zero.

³PRE1 is zero.

⁴AOR = Adjusted odds ratio.

⁵CI = Confidence interval.

⁶% of calf events in the nursing period. Health disorders = diarrhea + pneumonia + babesiosis/anaplasmosis.

Table 5. Cost of disease treatments during the 75-d nursing period.

Item	Treatments ¹				Treat	<i>P</i> -value		
	CTL	PRE1	PRE2	SEM ²		CTL vs. PRE1	CTL vs. PRE2	PRE1 vs. PRE2
	R\$/Calf							
Diarrhea	7.01	8.09	11.52	2.867	0.50	0.79	0.26	0.39
Pneumonia	23.61	25.93	19.05	7.349	0.75	0.80	0.62	0.46
Health disorders ³	38.91	35.18	33.29	8.331	0.88	0.75	0.63	0.87
	US\$/Calf ³							
Diarrhea	1.35	1.56	2.22	0.551				
Pneumonia	4.54	4.99	3.66	1.413				
Health disorders ⁴	7.48	6.77	6.40	1.602				

¹ Treatments = Control (CTL) and prebiotics PRE1 and PRE2.

² SEM = Standard error of the means.

³ 5.20 R\$ = 1 US\$

⁴ Fever + diarrhea + pneumonia + babesiosis/anaplasmosis.

Table 6. Milk replacer intake during weeks of the nursing period.

Weeks	Treatments ¹				P-value			
	CTL	PRE1	PRE2	SEM ²	Treat	CTL vs. PRE1	CTL vs. PRE2	PRE1 vs. PRE2
	L/d							
1	7.0	6.9	7.0	0.17	0.99	0.90	0.93	0.98
2	7.2	7.2	7.4	0.25	0.82	0.93	0.62	0.56
3	7.0	6.9	7.0	0.22	0.99	0.88	0.96	0.92
4	7.0	6.3	7.1	0.22	0.02	0.02	0.87	0.01
5	6.8	6.8	7.2	0.32	0.57	0.87	0.42	0.33
6	6.8	7.0	7.1	0.29	0.71	0.59	0.42	0.79
7	7.2	7.1	7.3	0.28	0.91	0.82	0.84	0.67
8	7.2	7.1	7.6	0.24	0.21	0.88	0.15	0.10
9	5.9	6.3	6.0	0.22	0.13	0.04	0.43	0.21
10	5.1	5.0	5.1	0.07	0.50	0.39	0.79	0.26
11	5.0	5.0	5.0	0.01	0.41	0.99	0.25	0.25
1 to 11 ³	6.6	6.5	6.7	0.08	0.19	0.42	0.32	0.07

¹Treatments = Control (CTL) and prebiotics PRE1 and PRE2.

²SEM = Standard error of the means.

³Repeated measures approach: $P < 0.01$ for the fixed effect of week (1 to 11) and $P = 0.76$ for the interaction of treatment and week.

Table 7. Milk replacer intake, body weight (BW), and feed efficiency (FE = BW gain/Milk replacer intake) in periods between birth (B), dehorning (D), and weaning (W).

Item	Treatments ¹				<i>P</i> -value			
	CTL	PRE1	PRE2	SEM ²	Treat	CTL vs. PRE1	CTL vs. PRE2	PRE1 vs. PRE2
Age	days							
D	34.9	35.1	34.7	0.83	0.89	0.78	0.85	0.64
W	75.1	74.3	75.9	0.58	0.85	0.71	0.85	0.57
Milk intake ³	L/d							
B to D	7.0	6.8	7.1	0.12	0.27	0.27	0.66	0.13
D to W	6.3	6.3	6.5	0.11	0.54	0.80	0.29	0.42
B to W	6.6	6.6	6.8	0.09	0.55	0.94	0.37	0.33
BW	kg							
B	41.4	41.6	41.9	1.13	0.95	0.92	0.75	0.84
D	57.8	55.8	59.1	1.43	0.27	0.33	0.51	0.10
D CV ⁴	57.9	55.8	58.9	1.11	0.15	0.18	0.56	0.06
W	80.9	78.6	82.8	2.59	0.51	0.53	0.60	0.25
W CV ⁴	81.1	78.6	82.5	2.18	0.46	0.43	0.67	0.22
BW gain	g/d							
B to D	471	407	499	33.8	0.16	0.18	0.56	0.06
D to W	598	586	612	56.0	0.95	0.89	0.85	0.74
B to W ⁵	533	497	554	30.0	0.41	0.43	0.67	0.22
B to W ⁶	534	497	556	29.4	0.36	0.37	0.61	0.16
B to W ⁷	533	497	553	30.2	0.42	0.41	0.64	0.20
FE ⁸	g/g							
B to D	0.46	0.40	0.48	0.033	0.24	0.23	0.66	0.10
D to W	0.65	0.63	0.65	0.057	0.97	0.86	0.97	0.82
B to W ⁵	0.55	0.51	0.56	0.029	0.45	0.34	0.82	0.24
B to W ⁶	0.55	0.52	0.57	0.029	0.46	0.37	0.76	0.23
B to W ⁷	0.55	0.51	0.56	0.029	0.47	0.35	0.83	0.25

¹Treatments = Control (CTL) and prebiotics PRE1 and PRE2.

²SEM = Standard error of the means.

³Dry matter = 14.6%. Mcal/kg dry matter = 4.6.

⁴Birth weight used as covariate in the statistical model. $P < 0.01$ for the covariate effect.

⁵Body weight at weaning – Body weight at birth.

⁶Repeated measures approach. $P < 0.01$ for the fixed effect of period (birth to dehorning and dehorning to weaning) and $P \geq 0.83$ for the interaction of treatment and period.

⁷Body weight gain is the slope of the linear regression of body weight over ages (d) at birth, dehorning, and weaning.

⁸Weight gain divided by milk replacer solids intake.

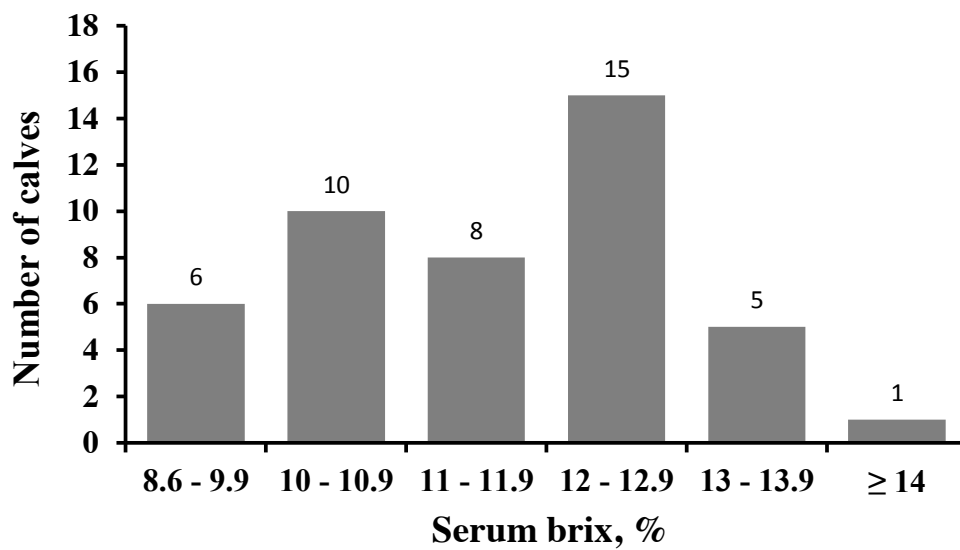
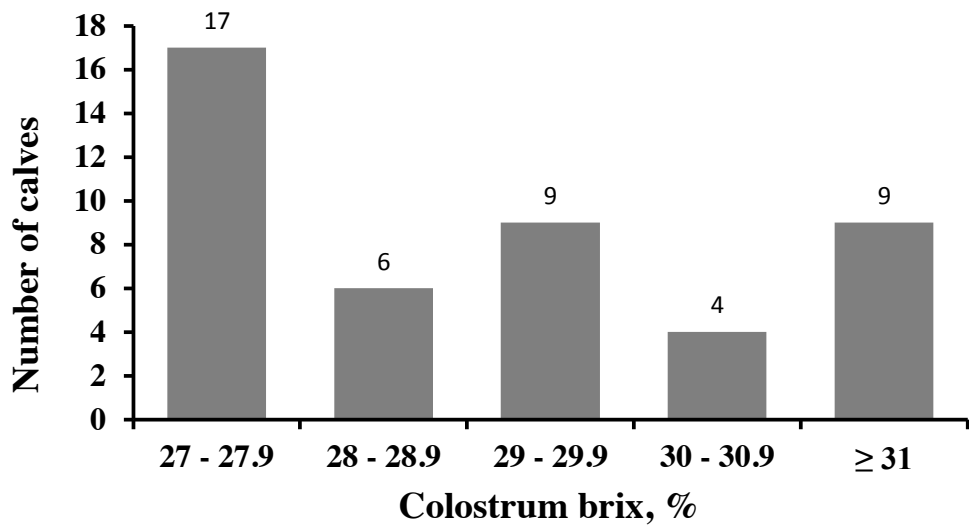


Figure 1. Brix of colostrum and brix of serum of 45 calves 24 h post-colostrum feeding. Serum brix: Control (CTL) = 11.8%. PRE1 = 11.3%. PRE2 = 11.3%. SEM = 0.37. *P*-value: CTL vs. PRE1 = 0.32. CTL vs. PRE2 = 0.47. PRE1 vs. PRE2 = 0.78.

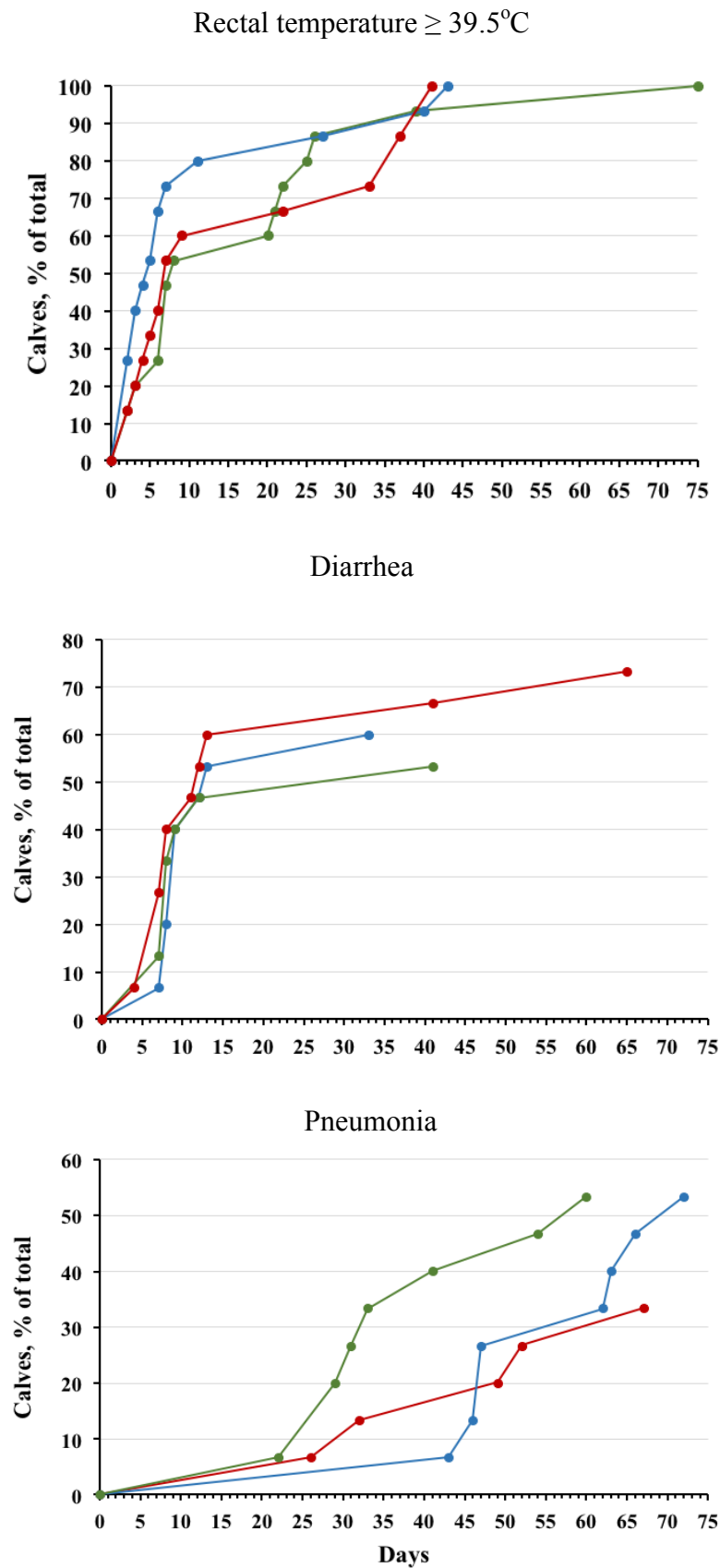


Figure 2. Survival curve for the first event of rectal temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$ (LogRank = 0.52 and Wilcoxon = 0.24), diarrhea (LogRank = 0.53 and Wilcoxon = 0.56), and pneumonia (LogRank = 0.41 and Wilcoxon = 0.32) during the nursing period on treatments Control (\bullet), PRE1 (\bullet), and PRE2 (\bullet).

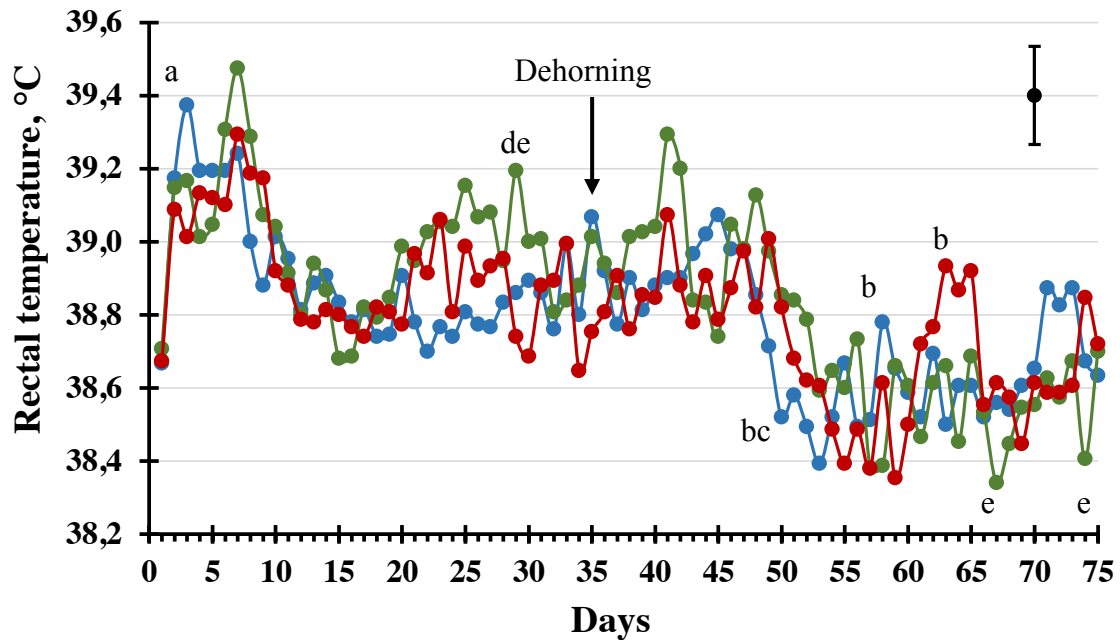


Figure 3. Rectal temperature during the nursing period on treatments Control (●), PRE1 (●), and PRE2 (●). $P = 0.27$ for fixed effect of treatment, $P < 0.01$ for fixed effect of day, and $P = 0.89$ for the interaction of treatment and day. P -values: CTL vs. PRE1 = 0.15. CTL vs. PRE2 = 0.98. PRE1 vs. PRE2 = 0.16. Slice option of SAS: ^aCTL vs. PRE2 = 0.02. ^bCTL vs. PRE2 ≤ 0.08 . ^cCTL vs. PRE1 = 0.05. ^dCTL vs. PRE1 = 0.10. ^ePRE1 vs. PRE2 ≤ 0.04 .

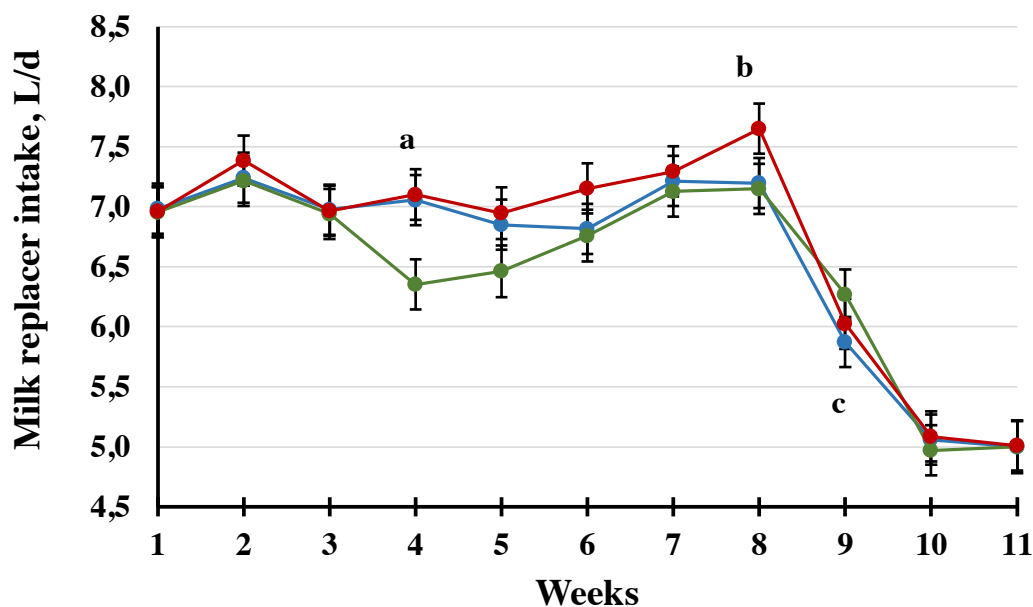
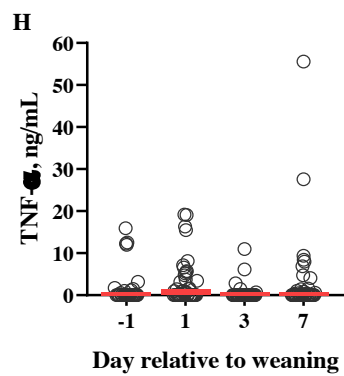
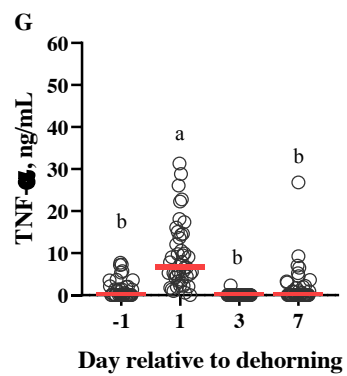
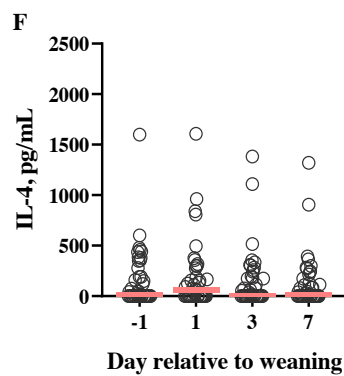
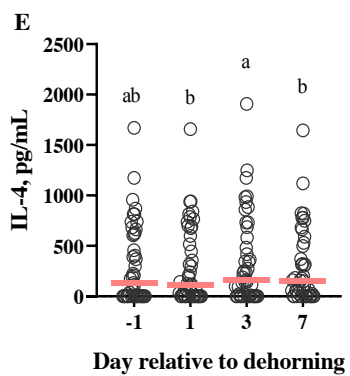
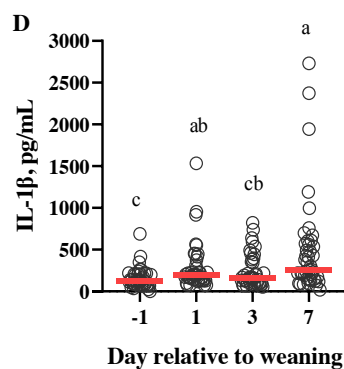
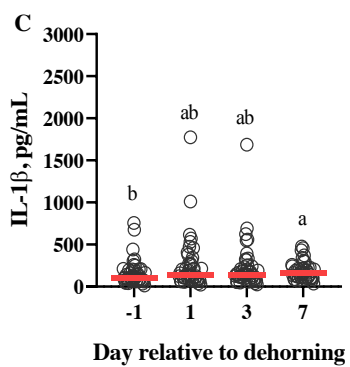
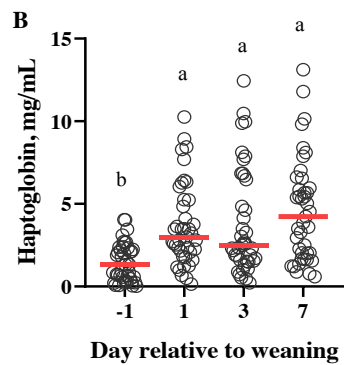
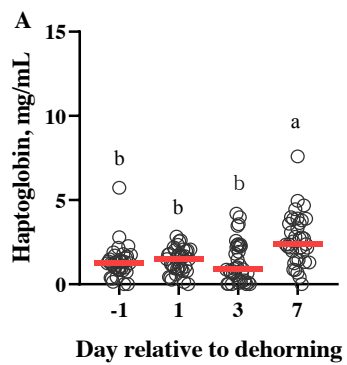


Figure 4. Milk replacer intake during weeks of the nursing period on treatments Control (●), PRE1 (●), and PRE2 (●). $P = 0.19$ for fixed effect of treatment, $P < 0.01$ for fixed effect of week, and $P = 0.76$ for the interaction of treatment and week. P -values: CTL vs. PRE1 = 0.42. CTL vs. PRE2 = 0.32. PRE1 vs. PRE2 = 0.07. Slice option of SAS: ^aCTL vs. PRE1 and PRE1 vs. PRE2 ≤ 0.02 . ^bPRE1 vs. PRE2 = 0.10. ^cCTL vs. PRE1 = 0.04.



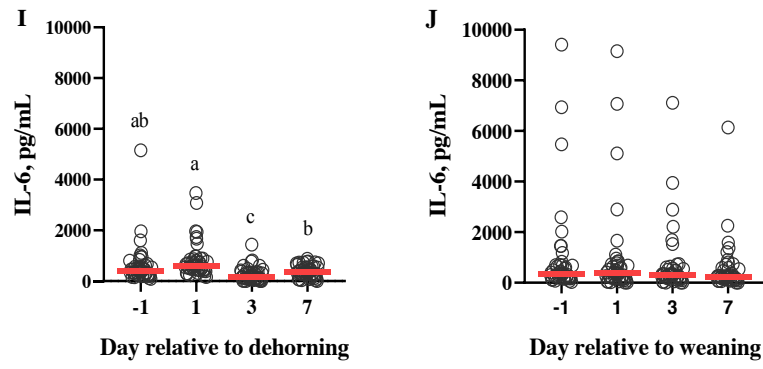
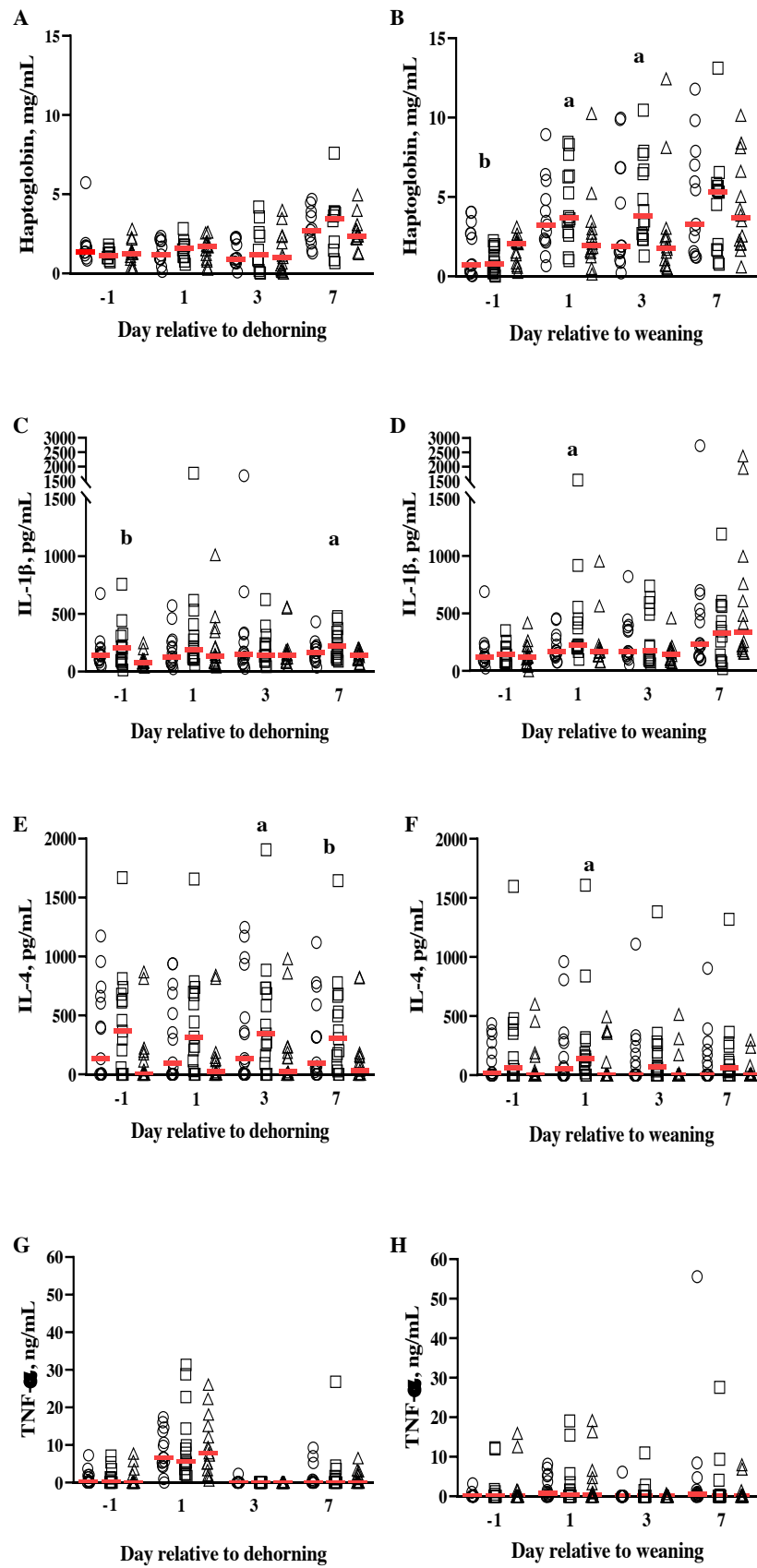


Figure 5. Serum concentration of haptoglobin, IL-1 β , IL-4, TNF- α and IL-6 before and after dehorning and weaning. Median (Red horizontal line). Friedman test $P \leq 0.05$.



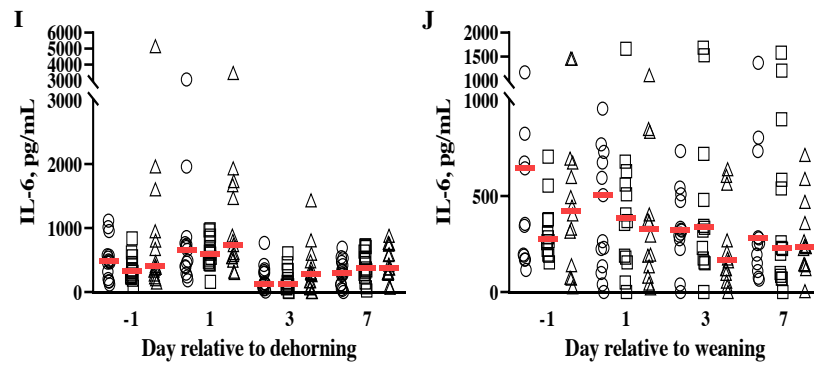


Figure 6. Serum concentration of haptoglobin, IL-1 β , IL-4, TNF- α and IL-6 before and after dehorning and weaning. Median (Red horizontal line). Control (○) and prebiotics PRE1 (□) and PRE2 (Δ). Kruskal-Wallis test.

A: CTL vs. PRE1, CTL vs. PRE2, and PRE1 vs. PRE2, $P \geq 0.49$.

B: ^aDay 1 and 3 (PRE1 vs. PRE2, $P \leq 0.08$). ^bDay -1 (PRE1 vs. PRE2, $P = 0.13$).

C: ^aDay 7 (PRE1 vs. PRE2, $P = 0.08$). ^bDay -1 (PRE1 vs. PRE2, $P = 0.01$; CTL vs. PRE2, $P = 0.08$).

D: ^aDay 1 (CTL vs. PRE1 and PRE1 vs. PRE2, $P = 0.07$).

E: ^aDay 3 (PRE1 vs. PRE2, $P = 0.15$) ^bDay 7 (PRE1 vs. PRE2, $P = 0.10$).

F: ^aDay 1 (PRE1 vs. PRE2, $P = 0.10$).

G: CTL vs. PRE1, CTL vs. PRE2, and PRE1 vs. PRE2, $P \geq 0.61$.

H: CTL vs. PRE1, CTL vs. PRE2, and PRE1 vs. PRE2, $P \geq 0.42$.

I: CTL vs. PRE1, CTL vs. PRE2, and PRE1 vs. PRE2, $P \geq 0.19$.

J: CTL vs. PRE1, CTL vs. PRE2, and PRE1 vs. PRE2, $P \geq 0.24$.