

Estudo de dose-resposta de beta-glucana em bezerros: resultados iniciais

Gabriella B. Esteves⁽¹⁾, Rafaella S. S. Zanette⁽²⁾, Danielle S. C. Pinto^(2,3), Melissa S. Mongelli^(2,3), Michelle D. A. Loures⁽⁴⁾
Robson S. Barducci⁽⁵⁾, Humberto M. Brandão^(6,7)

⁽¹⁾ graduanda em Ciências Biológicas – UniAcademia – Centro Universitário. E-mail: gabriellabesteves@gmail.com, ⁽²⁾Bolsista Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽³⁾UFLA, Lavras, MG, ⁽⁴⁾ Analista Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁵⁾Biorigin, ⁽⁶⁾Pesquisador Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: humberto.brandao@embrapa.br, ⁽⁷⁾Orientador.

Resumo- A busca por compostos que contribuam para a redução do uso de antibióticos em sistemas de produção de leite tem sido objeto de profundo estudo para prevenir a seleção de bactérias multirresistentes. Especificamente na fase de aleitamento, o bezerro está passando por um intenso processo de adaptação do sistema imune, no qual a imunidade passiva vai gradualmente diminuindo enquanto a imunidade adaptativa é moldada para enfrentar os desafios ambientais. Este é um período da vida do bezerro no qual o uso de imunoestimulantes pode contribuir significativamente para a redução do uso de antibióticos. Especificamente a β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de induzir a imunidade treinada em monócitos e macrófagos, portanto com grande aplicabilidade na bovinocultura leiteira. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade bactericida por fagocitose de leucócitos bovinos oriundos de bezerros tratados por 28 dias com β -glucana nas concentrações de 0 mg/kg/dia, 12 mg/kg/dia, 36 mg/kg/dia, 60 mg/kg/dia e 84 mg/kg/dia. Apesar de não ter sido encontrada diferença entre os tratamentos, a atividade fagocitária dos animais tratados com doses diárias de 60 mg/kg e 84 mg/kg foram numericamente mais elevadas. Assim, resultados mais conclusivos só poderão ser obtidos quando analisados em conjunto com resultados de outras análises que estão em andamento.

Termos para indexação: cbeta-glucana; dose-resposta; imunomodulador.

Beta-glucan dose-response study in calves: preliminary results

Abstract- The search for compounds that assist in reducing the use of antibiotics in dairy production systems has been the subject of in-depth study to prevent the selection of multi-resistant bacteria and in the pursuit of sustainability. Specifically in the suckling phase, the calf is undergoing an intense adaptation of the immune system, in which passive immunity gradually decreases. In contrast, adaptive immunity is shaped to face environmental challenges. This is a period in the calf's life in which immunostimulants use can significantly reduce antibiotic usage. Specifically, β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* can induce trained immunity in monocytes and macrophages, thus with great applicability in dairy cattle farming. In this context, the present study aims to evaluate the bactericidal activity by phagocytosis of bovine leukocytes from calves treated with β -glucan for 28 days at concentrations of 0 mg/kg/day, 12 mg/kg/day, 36 mg/kg/day, 60 mg/kg/day, and 84 mg/kg/day. Although no differences were found between the treatments, the phagocytic activity of

animals treated with daily doses of 60 and 84 mg/kg was numerically higher. Therefore, more conclusive results can only be obtained when analyzed in conjunction with other ongoing analyses.

Index terms: beta-glucan; dose-response; immunomodulator.

Introdução

Durante os últimos anos tem crescido a demanda por produtos que possam estimular a capacidade de resposta imune de animais de produção, de modo a promover o bom desempenho produtivo e garantir a homeostase do organismo em uma condição de uso restrito de antibióticos.

Para atender esta demanda crescente de mercado, inúmeras classes de produtos vêm sendo desenvolvidas e colocadas no mercado animal, como, por exemplo, os probióticos, prebióticos, homeopáticos, imunomoduladores e outros mais.

Na bovinocultura leiteira, existem dois momentos críticos nos quais a imunidade do animal é mais exigida, I) em bezerros na fase de desmame, quando a importância da imunidade passiva diminui e a imunidade adquirida assume a relevância principal na defesa do organismo; II) e no período de transição, entre o final de uma lactação e o pós-parto imediato, quando animais de alta produção ficam expostos a desordens metabólicas (*i.e.* hipocalcemia e cetose) que diminuem a capacidade fagocitária das células do sistema imune. Como consequência, em bezerros observam-se elevados índices de pneumonias e diarreias, enquanto as vacas na fase produtiva apresentam elevada taxa de mastite e metrite.

Nesse período o bezerro está passando por um intenso processo de adaptação do sistema imune, no qual a imunidade passiva vai gradualmente diminuindo enquanto a imunidade adaptativa é moldada para enfrentar os desafios ambientais. Cerca de 90% dos casos de diarreia em bezerros ocorrem nos primeiros 150 dias de vida. A diarreia é responsável por cerca de 10 a 30% das mortes de bezerros (Chagas, 2015). Adicionalmente, lesões graves decorrentes de distúrbios entéricos podem acarretar a formação de áreas cicatriciais ao longo do epitélio intestinal, resultando em perda da eficiência absorptiva de nutrientes por toda a vida do animal. Portanto, o período de aleitamento é uma fase da vida do animal no qual o uso de imunomoduladores pode apresentar grandes ganhos biológicos e, portanto, maior potencial de uso.

No que tange aos imunoestimulantes, para atender esse segmento de mercado crescente (alternativas ao uso de antibióticos), a beta-glucana *Saccharomyces cerevisiae* surge como uma alternativa promissora para esta aplicação, o que é respaldado por diversos artigos que demonstram atividade imunomoduladora desse biopolímero em bovinos (Finck et al., 2014; Yuan et al., 2015; Gimenes et al., 2020). Todavia, após uma ampla revisão na literatura, não foram identificados estudos de dose-resposta com beta-glucana nessa espécie, o que pode gerar falhas de uso desse promissor biopolímero na bovinocultura.

Dentro desse contexto, é necessária a realização do estudo de dose-resposta para definir a melhor condição de uso da beta-glucana em bezerros. Assim, o presente trabalho

teve por objetivo avaliar a atividade bactericida por fagocitose de leucócitos bovinos oriundos de bezerros tratados por 28 dias com β -glucana nas concentrações de 0 mg/kg/dia, 12 mg/kg/dia, 36 mg/kg/dia, 60 mg/kg/dia e 84 mg/kg/dia. Os resultados obtidos vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 2: “Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 3 - Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos; ODS 12: “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e métodos

Para a realização do experimento, foram utilizados 35 bezerros girolando (CEUA 8734060422) com sessenta dias de vida, distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos, os quais receberam por via oral 0 mg/kg/dia, 12 mg/kg/dia, 36 mg/kg/dia, 60 mg/kg/dia e 84 mg/kg/dia de β -glucana (Macrogard da Biorigin®) durante 28 dias. No 28º dia os animais foram imunologicamente desafiados por meio da aplicação oral de 1×10^9 UFC de *E. coli*. Cada animal permaneceu no experimento por 33 dias e amostras de sangue periférico foram coletadas nos tempos: 0 dias, 28 dias e 33 dias após o início da administração da β -glucana para avaliar capacidade fagocitária das células mononucleares. As células mononucleares foram obtidas pela técnica de lise de hemácia seguida de centrifugação e cultivo em estufa de CO₂ a 5% por 48 horas (concentração inicial de 4×10^6 leucócitos por poço) (Dorella et al., 2009; Feitosa et al., 2011; Valdivia et al., 2012). Após esse período as células não aderentes foram descartadas para realização do ensaio de fagocitose em co-cultivo de *E. coli* (25.000 UFC/mL). O co-cultivo celular foi realizado em meio RPMI, onde 10 μ L de amostra foi plaqueado em agar BHI para determinar a UFC (unidade formadora de colônias) nos tempos 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos e 30 minutos pós inoculação bacteriana.

Resultados e discussão

A fagocitose é considerada a primeira resposta imune inata celular do organismo contra patógenos. Após vinte e quatro horas de cultivo bacteriológico, a porcentagem de UFCs em relação à quantidade inicial foi utilizada para determinar a capacidade fagocitária de monócitos de bovinos tratados com beta-glucana frente a *E. coli* (Tabela 1).

Tabela 1. Teste da capacidade de fagocitose de monócitos de bovinos após administração oral de cinco diferentes doses 0, 12, 36, 60 e 84 mg/kg de peso vivo/dia de beta-glucana (G0, G1, G2, G3 e G4) nos dias 1, 29 e 33 (D01, D29 e D33). Os valores estão representados pela porcentagem média em relação ao controle da contagem do número de colônias de *E. coli* ($p > 0,05$).

Tempo (min) / Tratamento	5 min	10 min	20 min	30 min
G0 D1	92,02899	81,88406	106,5217	108,6957
G0 D28	106,4815	118,5185	117,5926	93,05556
G0 D33	65,15152	59,09091	53,0303	68,18182
G1 D1	88,66667	80,00000	71,33333	86,00000
G1 D28	54,16667	64,93056	70,13889	77,77778
G1 D33	77,19298	82,45614	61,84211	62,2807
G2 D1	115,9722	106,25	53,47222	70,13889
G2 D28	115,0685	99,08676	82,19178	111,4155
G2 D33	108,1871	115,7895	88,88889	82,45614
G3 D1	74,02597	100,8658	93,50649	93,07359
G3 D28	78,86179	55,28455	76,42276	70,73171
G3 D33	74,02597	100,8658	93,50649	93,07359
G4 D1	76,37681	94,92754	83,91304	83,91304
G4 D28	75,68306	84,42623	66,39344	51,36612
G4 D33	109,0909	114,1414	67,67677	89,89899

*tabela com dados preliminares

Apesar de não ter sido identificada diferença significativa entre os tratamentos, numericamente a porcentagem de redução de UFCs foi mais evidente nos tratamentos G3 e G4 após 28 dias de administração de β -glucana. O ensaio de fagocitose avalia a quantidade de bactérias fagocitadas e mortas pelas células do sistema imune. A ausência de diferença entre os tratamentos pode ser explicada pela elevada variabilidade de resultados observados no ensaio de atividade bactericida por fagocitose (Green et al., 2007).

Por outro lado, os valores de porcentagem de redução de UFCs mais evidente (numericamente) nos tratamentos G3 e G4 após 28 dias de administração de β -glucana estão alinhados com relatos de literatura que evidenciam que a β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de induzir a imunidade treinada em monócitos e macrófagos de modelos murinos e humanos (Bekkering et al., 2016; García-Valtanen et al., 2017).

Para complementar as informações, mais estudos estão em condução para examinar os mecanismos de indução da imunidade treinada em monócitos de bovinos. Dessa forma, teste de expressão gênica, quantificação celular, bioquímica sanguínea, imunohistoquímica, produção de interleucinas e análises dos resultados dos ensaios clínicos ainda serão realizados para compor os resultados finais do experimento.

Conclusões

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos com diferentes concentrações de β -glucana, os valores numéricos do ensaio de fagocitose sinalizam para resultados que podem ser promissores quanto ao uso da β -glucana nas

concentrações de 60 mg/kg/dia e 84 mg/kg/dia. Contudo, conclusões definitivas somente serão obtidas após as análises conjuntas dos resultados de expressão gênica, quantificação celular, bioquímica, imunohistoquímica, produção de interleucinas e análises dos resultados dos ensaios clínicos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fapemig e Biorigin.

Referências

- BEKKERING, S.; BLOK, B. A.; JOOSTEN, L. A.; RIKSEN, N. P.; VAN CREVEL, R.; NETEA, M. G. In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 12, p. 926-933, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/cvi.00349-16>.
- CHAGAS, A. C. de S. (ed.). **Diarréia em bezerros leiteiros lactantes: a doença e o manejo em diferentes unidades da Embrapa**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2015. 43 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 120).
- DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205-213, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1586/14760584.8.2.205>.
- FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R.; PINHEIRO, A. A.; AZEVEDO, D. A. A.; ALVES, S. M. Primeiro isolamento de lentivírus de pequenos ruminantes em caprino naturalmente infectado em rebanho do Rio Grande do Norte, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 501-505, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v78p5012011>.
- FINCK, D.; RIBEIRO, F.; BURDICK, N.; PARR, S.; CARROLL, J.; YOUNG, T.; BERNHARD, B.; CORLEY, J.; ESTEFAN, A.; RATHMANN, R.; JOHNSON, B. Yeast supplementation alters the performance and health status of receiving cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 3, p. 333-341, 2014. DOI: [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30125-X](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30125-X).
- GARCÍA-VALTANEN, P.; GUZMAN-GENUINO, R. M.; WILLIAMS, D. L.; HAYBALL, J. D.; DIENER, K. R. Evaluation of trained immunity by β -1, 3 (d)-glucan on murine monocytes in vitro and duration of response in vivo. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, p. 601-610, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/icb.2017.13>.
- GIMENES, G.; DIAS, E.; DIAS, S.; BASTOS, G.; GERBASI, A.; ALMADA, A.; BORGES, J.; GONÇALVES, D.; SIMÕES, J.; PIAU JÚNIOR, R. Eficácia da suplementação oral com 1,3-1,6 betaglucono proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1441-1448, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10556>.
- GREEN, J. N.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Analysis of neutrophil bactericidal activity. In: QUINN, M. T.; DELEO, F. R.; BOKOCH, G. M. (ed.). **Neutrophil methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2007. p. 319-322. (Methods in Molecular Biology, v. 412). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-467-4_21.
- VALDIVIA, J.; REAL, F.; ACOSTA, F.; ACOSTA, B.; DÉNIZ, S.; RAMOS-VIVAS, J.; ELAAMRI, F.; PADILLA, D. Interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with ovine cells in vitro. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 2, p. 318-323, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985812452579>.
- YUAN, K.; MENDONÇA, L.; HULBERT, L.; MAMEDOVA, L.; MUCKEY, M.; SHEN, Y.; ELROD, C.; BRADFORD, B. Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3236-3246, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8469>.