

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Tese

**Avaliação da silagem de colostro equino e potencial probiótico de
Lactiseibacillus casei P054 oriundo de colostro bovino**

Carolina Litchina Brasil

Pelotas, 2021

Carolina Litchina Brasil

**Avaliação da silagem de colostro equino e potencial probiótico de
Lactocaseibacillus casei P054 oriundo de colostro bovino**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Área do conhecimento: Microbiologia).

Orientadora: Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B823a Brasil, Carolina Litchina

Avaliação da silagem de colostro equino e potencial probiótico de *Lactibacillus casei* P054 oriundo de colostro bovino / Carolina Litchina Brasil ; Daniela Isabel Brayer Pereira, orientadora. – Pelotas, 2021.

104 f. : il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Alimentação. 2. Bovino. 3. Fermentação anaeróbica.
4. Silagem de colostro. 5. Sistema imunológico. I. Pereira, Daniela Isabel Brayer, orient. II. Título.

CDD : 636.20855

Carolina Litchina Brasil

Avaliação da silagem de colostro equino e potencial probiótico de *Lacticaseibacillus casei* P054 oriundo de colostro bovino

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 01/03/2021

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte
Doutora em Ciências e tecnologia de alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Doutor em Ciências dos alimentos pela Universidade de São Paulo

Dr^a. Juliana de Lima Marques
Doutora em Ciências e tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Francisco Denis Souza Santos
Doutor em Biotecnologia Universidade Federal de Pelotas

Dr. Amilton Seixas Neto (suplente)
Doutor em Biotecnologia Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À Deus, pela saúde, pela paciência e perseverança. Por me fazer cair quando me senti suficiente e me fazer levantar quando perdi a confiança.

À minha família pela educação e valores pessoais, pelo incentivo, e por todo amor.

À minha orientadora Daniela Pereira por confiar e acreditar em minha capacidade durante esses quase 6 anos de pós-graduação. Agradeço por toda amizade, liberdade, ensinamentos e acolhimento. Meus agradecimentos se estenderiam demasiadamente se optasse por citar tamanho importância e significado em minha vida, são indescritíveis.

Ao meu co-orientador Fábio Leite, pela confiança, pelo apoio, incentivo, auxílio e amizade contruídas.

Ao nosso grupo de pesquisa, ao laboratório de microbiologia de alimentos e ao lab. IV que me ofereceu todo o apoio sem medir esforços, as amizades construídas ao longo de nosso convívio, levarei para sempre em minha vida.

À Universidade Federal de Pelotas por minha formação acadêmica na pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia e todos os professores integrantes que contribuíram com o conhecimento científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Ao Guilherme por me fazer uma pessoa melhor, pela amizade, carinho, alegria, pela simplicidade e pelo que construímos até o momento.

Resumo

BRASIL, Carolina Litchina. **Avaliação da silagem de colostro equino e potencial probiótico de *Lacticaseibacillus casei* P054 oriundo de colostro bovino**. 2021. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A fermentação é um processo para obter energia sem a presença de gás oxigênio, a fermentação anaeróbica do colostro (silagem de colostro) é uma opção de acondicionamento e manutenção dos constituintes nutricionais desse alimento sem necessidade de resfriamento. A importância da silagem de colostro é que a manutenção de características físicas e químicas para obter o colostro *in natura*, como também a presença de microrganismos com potencial probiótico. Neste contexto, o presente estudo objetivou em avaliar a silagem de colostro equino e testar a atividade probiótica *in vitro* de *Lacticaseibacillus casei* P054 oriundo de colostro e silagem de colostro bovino. Os resultados evidenciaram que *L. casei* P054 tolerou as diferentes condições adversas, não havendo redução de seu crescimento celular. Observou-se também que o isolado demonstrou atividade antagonista frente aos patógenos testados, todos os antimicrobianos testados, com exceção da sulfonamida e sobreviveu ao trânsito gastrointestinal simulado. Os resultados permitem sugerem que o isolado *L. casei* P054 apresenta potencial probiótico *in vitro*. Posteriormente, bovinos (n=10) receberam por via oral uma suspensão de 4×10^9 UFC de *L. casei*. Bovinos do grupo controle (n=10) receberam 20 mL de solução PBS. Os animais foram tratados diariamente durante 35 dias. Cinco dias após o início dos tratamentos, os bovinos foram vacinados com vacina comercial contra IBR, sendo revacinados 21 dias após a primeira dose. A estimulação *in vitro* de esplenócitos bovinos com *L. casei* P054 evidenciou significativo aumento dos níveis de transcrição do mRNA de IL2, IL4, IL10 e IL17 quando comparado ao controle estimulado com Concanavalina. Observou-se que a partir de sete dias, após a primeira dose de vacina até o final do experimento, o grupo de animais que recebeu suplementação, evidenciou níveis superiores de IgG anti-BoHV-1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, os níveis de transcrição de mRNA para IL2, IL4, IL10 e IL17 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos animais suplementados foram superiores aos animais controle ($p < 0,05$). Trinta e cinco amostras de colostro equino foram coletadas e avaliadas quanto as características físico-químicas, microbiológicas e concentração de imunoglobulina G. Para elaboração da silagem, o colostro foi acondicionado em frascos esterilizados e a fermentação foi avaliada no período de 21 a 730 dias. Todavia, verificou-se que um dos limitantes para o emprego da técnica é a quantidade de colostro produzida pela fêmea. Portanto, os resultados demonstram que a fermentação anaeróbica do colostro equino até 365 dias mante os constituintes colostrais avaliados semelhantes ao colostro *in natura* e *L. casei* P054 tem potencial como probiótico *in vitro* e induz efeito imunomodulador em esplenócitos bovino, por isso, a suplementação de bovinos com *L. casei* P054 tem efeito como modulador na resposta imune contra a vacina BoHV-1.

Palavras-chave: Alimentação; Bovino; Fermentação anaeróbica; Silagem de colostro; Sistema imunológico.

Abstract

BRASIL, Carolina Litchina. ***Evaluación del ensilaje de calostro equino y el potencial probiótico de *Lactocaseibacillus casei* P054 a partir de calostro bovino***. 2021. 104f. Thesis (Doctor degree in Biological Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Fermentation is a process to obtain energy without the presence of oxygen gas, the anaerobic fermentation of colostrum (colostrum silage) is an option for packaging and maintaining the nutritional constituents of this food without the need for cooling. The importance of colostrum silage is that the maintenance of physical and chemical characteristics to obtain colostrum in natura, as well as the presence of microorganisms with probiotic potential. In this context, the present study aimed to evaluate equine colostrum silage and test the in vitro probiotic activity of *Lactocaseibacillus casei* P054 from colostrum and bovine colostrum silage. The results showed that *L. casei* P054 tolerated different adverse conditions, with no reduction in its cell growth. It was also observed that the isolate showed antagonist activity against the tested pathogens, all antimicrobials tested, with the exception of sulfonamide and survived the simulated gastrointestinal transit. The results suggest that the isolate *L. casei* P054 has probiotic potential in vitro. Subsequently, cattle (n=10) received orally a suspension of 4×10^9 CFU of *L. casei*. Control group cattle (n=10) received 20 mL of PBS solution. The animals were treated daily for 35 days. Five days after the beginning of the treatments, the cattle were vaccinated with commercial vaccine against IBR, being revaccinated 21 days after the first dose. In vitro stimulation of bovine splenocytes with *L. casei* P054 showed a significant increase in IL2, IL4, IL10 and IL17 mRNA transcription levels when compared to control stimulated with Concanavalin. It was observed that from seven days after the first dose of vaccine until the end of the experiment, the group of animals that received supplementation showed higher levels of anti-BoHV-1 IgG ($p < 0.05$). Additionally, mRNA transcription levels for IL2, IL4, IL10 and IL17 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from supplemented animals were higher than control animals ($p < 0.05$). Thirty-five equine colostrum samples were collected and evaluated for physicochemical, microbiological and immunoglobulin G concentration. However, it was found that one of the limitations for the use of the technique is the amount of colostrum produced by the female. Therefore, the results demonstrate that the anaerobic fermentation of equine colostrum up to 365 days maintains the evaluated colostrum constituents similar to in natura colostrum and *L. casei* P054 has potential as a probiotic in vitro and induces an immunomodulatory effect in bovine splenocytes, therefore, supplementation of cattle with *L. casei* P054 has an effect as a modulator in the immune response against the BoHV-1 vaccine.

Keywords: Food; Bovine; Anaerobic fermentation; colostrum silage; Immune system.

Lista de Figuras

Figura 1 – Highlights	47
Figura 2 - L. casei P054	48
Figura 3 - Análise da alimentação	64
Figura 4 - Resistência do Lactobacillus casei P054 a condições adversas (tolerância à acidez, sais biliares e fenol)	65
Figura 5 - Perfil de suscetibilidade de Lactobacillus casei P054	66
Figura 6 - Porcentagens de autoagregação e coagregação de Lactobacillus casei P054 em diferentes temperaturas e períodos de incubação	67
Figura 7 - Declaração de interesse	68
Figura 8 - Dinâmica de IgG contra BoHV-1 em bovinos vacinados com Cattle Master® e suplementados com L. casei P054. Os dados representam as médias e desvio padrão da média dos valores de absorbâncias obtidos por ELISA indireto do grupo suplementado e controle durante o período experimental. (*) indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre o grupo suplementado com L. casei P054 e o grupo controle.	77
Figura 9 - Transcrição relativa de mRNA das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 a partir do cultivo de esplenócitos bovinos in vitro. Os valores apresentados representam média e desvio padrão da média de $2^{\Delta\Delta Ct}$ obtidos pela técnica de qPCR. A) Transcrição relativa de mRNA de IL-4; B) Transcrição relativa de mRNA de IL-10; C) Transcrição relativa de mRNA de IL-2 e D) Transcrição relativa de mRNA de IL-17. (*) indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre as células estimuladas com L.casei P054 e as células estimuladas com ConcA.	78
Figura 10 -Transcrição relativa de mRNA das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 a partir do cultivo de PBMC's de bovinos e estimuladas com L.casei P054. Os valores apresentados representam média e desvio padrão da média de $2^{\Delta\Delta Ct}$ obtidos pela técnica de qPCR. A) Transcrição relativa de mRNA de IL-4; B) Transcrição relativa de mRNA de IL-10; C) Transcrição relativa de mRNA de IL-2 e D) Transcrição relativa de mRNA de IL-17. (*) indica diferença estatística entre o grupo suplementado com L. casei P054 e o grupo controle.	79

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Os valores de Ct obtidos pelo qPCR foram analisados pela seguinte fórmula (Livak & Schmittgen, 2001): $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	74
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

APCs	Células apresentadoras de antígeno
BAL	Bactérias ácido lácticas
BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
dL	Decilitro
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
Kg	Quilogramas
<i>L. casei</i>	<i>Lactocaseibacillus casei</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mg	Miligramas
NK	Natural Killer
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina fosfatada
PBS-T	Solução salina fosfatada contendo 0,05 % de Tween-20
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro

rpm	Rotação por minuto
TLRs	Receptores toll-like
Th	T auxiliar
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 Revisão de Literatura	17
3.1 Colostro	17
3.1.1 Colostro equino	18
3.1.2 Colostro bovino	19
3.2 Colostro fermentado anaerobicamente (silagem de colostro)	20
3.3 Probióticos	22
3.3.1 Mecanismos de ação do probióticos	23
3.3.2 Probióticos e resposta imune	24
3.3.3 Resposta imune	25
3.4 Lacticaseibacillus casei	27
4 Artigo	29
5 Manuscritos	44
5.1 Manuscrito 1	44
5.2 Manuscrito 2	69
6 Conclusões Finais	90
Referências	91
Anexo	103
Anexo A	104

1 Introdução

A produção de colostro ocorre no início da lactação, e esta depende de fatores hormonais, principalmente da secreção de progesterona. Dessa forma, o colostro não é importante apenas para o fornecimento de anticorpos, mas também de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento (SANTOS & ZANINE, 2006).

O colostro pode ser produzido tanto alguns dias, como algumas horas antes do parto. A secreção do colostro ocorre de uma só vez e a sua retirada antes do parto pode reduzir a quantidade de imunoglobulina necessária ao recém-nascido (SAAFELD et al., 2014; BATISTA et al., 2016; MALDONADO & NADER-MACIAS, 2016).

No decorrer da gestação ocorrem também, na glândula mamária, mudanças na composição da secreção do colostro, com a proximidade do parto. Dentre as alterações citam-se: concentração dos eletrólitos (principalmente cálcio, magnésio, sódio e potássio), alteração do pH e concentração de imunoglobulinas (CANISSO et al., 2013).

Algumas situações impedem o consumo do colostro pelo neonato imediatamente após o parto, seja por dificuldade ou incapacidade de ingestão, ou ainda por falha de produção por parte da fêmea, necessitando o fornecimento de uma fonte externa de colostro. Trabalhos conduzidos com colostro visam adequar melhores condições de armazenamento, substituindo o colostro *in natura* (SAAFELD, 2008).

A fermentação e o acondicionamento anaeróbico do colostro surgiram como uma opção de uso e manutenção da concentração de imunoglobulinas, sem a necessidade de resfriamento e com resultados promissores estudados em bovinos. Todavia, para espécie equina, ainda não há descrição da técnica e de sua utilização. Saalfeld (2008) estudou a silagem de colostro em bovinos como forma de aproveitamento do excesso de colostro produzido pela fêmea bovina, aumentando a conservação, ao armazenamento e a qualidade do colostro.

Durante pesquisas desenvolvidas por um conjunto de alunos de microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Departamento de Veterinária Preventiva e Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas, foi possível verificar que o colostro bovino fermentado anaerobicamente (silagem do colostro) manteve as características

físico-químicas e outros constituintes do colostro *in natura* (SAALFELD et al., 2013), bem como a concentração de imunoglobulinas (SAALFELD et al., 2014). Desta forma, considerado um alimento adequado à alimentação animal. Adicionalmente, a avaliação microbiológica do produto revelou que após 21 dias de fermentação, bactérias patogênicas de interesse na saúde animal não foram mais detectadas, restando viáveis apenas bactérias ácido lácticas (BAL), incluindo os gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* com provável potencial probiótico (SAALFELD et al., 2013).

Os probióticos são tipicamente, embora não necessariamente, bactérias comensais. Geralmente são geralmente BAL, mais comumente espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, bem como algumas cepas de *Escherichia coli* não patogênicas também são descritas como probióticos (BORCHER et al., 2009).

Ao nascer, o intestino dos animais apresenta-se estéril e a formação e composição da microbiota do trato gastrointestinal é estimulada logo após o parto, sendo induzida nas primeiras ingestas alimentares (UYENO et al., 2015). De acordo com Qadis et al. (2014) a formação dessa microbiota intestinal nas primeiras semanas de vida é importante para a constituição de um sistema imunológico viável.

Os mecanismos de ação dos probióticos incluem fatores que aprimoram as defesas naturais do organismo, como a alteração da microbiota intestinal, fortalecimento e modificação da barreira intestinal, produção de compostos com atividades anti-microbianas e modulação da resposta imune (THOMAS & VERSALOVIC, 2010).

Estudos demonstram que a utilização de probióticos como suplemento alimentar para ruminantes pode colaborar para uma maior produtividade na saúde desses animais, uma vez que confere maior capacidade de modulação da resposta imune além de alterar a microbiota ruminal (ABD EL-TAWAB et al. 2016; MANI et al. 2021; SANTOS et al. 2020).

A questão-problema é: qual o resultado da suplementação de bonivos com *Lactobacillus casei* P054 e o efeito da fermentação anaeróbica do colostro equino? A hipótese é que a atividade probiótica *in vitro* de *Lactobacillus casei* P054 tem efeito de imunomodulador como um suplemento aos ruminantes e a silagem de colostro em equinos resulta em aumento da conservação, do armazenamento e da qualidade do colostro.

69 A justificativa para essa pesquisa é devido à importância na divulgação de
70 pesquisas para a área de Microbiologia e Parasitologia, assim, o estudo evidencia
71 suplementação de bonivos, potencial probiótico e imunomodulação de
72 *Lactocaseibacillus casei* P054, silagem de colostro equino, composição do colostro
73 equino *in natura*, fermentação anaeróbica do colostro equino. Promovendo a
74 sociedade e área acadêmica estudos de casos com ruminantes e equinos, além de
75 apresentação de bibliografia para um maior entendimento à área.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição do colostro equino *in natura* e silagem de colostro equino, e investigar a atividade probiótica *in vitro* de *Lacticaseibacillus casei* P054.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a silagem de colostro equino em distintos períodos de fermentação.
- Determinar as características físico-químicas, a composição microbiológica e imunológica do colostro equino *in natura* e da silagem de colostro.
- Explicar o comportamento das características físico-químicas em distintos períodos de fermentação anaeróbica do colostro equino.
- Verificar *in vitro* o potencial probiótico de *Lacticaseibacillus casei* P054 de colostro e silagem de colostro bovino.
- Avaliar a capacidade de imunomodulação de *Lacticaseibacillus casei* P054 em esplenócitos bovino.
- Investigar o efeito imunomodulador da suplementação com *Lacticaseibacillus casei* P054 em bovinos.

3 Revisão de Literatura

3.1 Colostro

Estes animais são dependentes da secreção láctea produzida pela mãe ao nascimento, uma vez que não há passagem de anticorpos pela via placentária. O colostro é denominado como a primeira secreção láctea, que é um produto sintetizado pela glândula mamária e de elementos oriundos da corrente sanguínea, principalmente as imunoglobulinas (FOLEY & OTTERBY, 1978; MORRIL et al., 2012).

Uma das mais importantes funções do colostro é fornecer proteção imunológica e nutrição adequada para o recém-nascido (HOWE, 1921; SMITH & LITTLE, 1922; GODDEN, 2009). O colostro é rico em proteínas, imunoglobulinas, minerais, vitaminas e substâncias bioativas (FOLEY & OTTERBY, 1978; GEORGIEV, 2005; KEHOE et al., 2007; GODDEN, 2009; LIERMANN et al., 2020).

A absorção das imunoglobulinas do colostro ocorre no epitélio intestinal do recém-nascido por um processo ativo em que as moléculas são transportadas pelos enterócitos até atingirem a membrana basal, onde são absorvidas integralmente durante as primeiras horas de vida (QUIGLEY, 2004). Os níveis de imunoglobulina alcançam um pico de concentração sérica entre 12 e 48 horas de vida, sendo que após esse período a concentração média das imunoglobulinas tende a decrescer em decorrência do catabolismo (PAULETTI et al., 2005). O nível sérico de imunoglobulinas encontrado nos recém-nascidos, após receberem o colostro, pode ser afetado pelo tempo decorrido do nascimento até a primeira ingesta e pela concentração de imunoglobulinas ingeridas (MORIN et al., 1997; PRIESTLEY et al., 2013).

O colostro é estéril quando é excretado dos alvéolos mamários, porém à medida que passa pelos condutos do úbere pode sofrer diversas contaminações, podendo ser uma fonte de exposição a micro-organismos patogênicos para o recém-nascido (MCGUIRK & COLLINS, 2004; STEWART et al., 2005; GODDEN, 2009). A primeira secreção láctea também possui propriedades laxativas, que contribuem para a eliminação dos resíduos acumulados no intestino do feto durante a fase final da gestação, sob a forma de massa escura e viscosa conhecida como mecônio (SILVA et al., 2013).

Contudo, essa primeira secreção láctea é indispensável para o recém-nascido, pois, apresenta grande importância nutricional e auxílio na maturação do trato gastrointestinal, ainda confere imunidade passiva pela ingestão de imunoglobulinas (TAHMASBI et al., 2014; TIZARD, 2002).

3.1.1 Colostro equino

A espécie equina tem como característica a composição de uma placenta corioalantóide, a qual possibilita somente a passagem de pequenas moléculas, como aminoácidos e eletrólitos. As imunoglobulinas - moléculas grandes - não conseguem ultrapassar a barreira placentária. Dessa forma, os potros nascem agamaglobulinêmicos ou hipogamaglobulinêmicos, e assim dependem totalmente do colostro materno para adquirirem imunidade após o nascimento (JEFFCOTT, 1974; MCGUIRE et al., 1975; KOTERBA et al., 1990; LANG et al., 2007).

O colostro deve apresentar características físicas como, viscosidade e coloração amarelada, o que está relacionado a maiores concentrações de imunoglobulinas (KOTERBA et al., 1990; PRESTES & LADIM-ALVARENGA, 2006). A coloração e viscosidade estão relacionadas à gravidade específica e, conseqüentemente, à quantificação de imunoglobulinas presentes no colostro. Em estudo de Luz et al. (1992), com 60 éguas da raça Puro Sangue Inglês, foi observada uma relação diretamente proporcional entre estas características físico-químicas.

A imunoglobulina G (IgG) é mais abundante no colostro equino, enquanto a imunoglobulina (IgA) é o menor componente (PERKINS et al., 2014). Considerando as concentrações séricas, observa-se que os isotipos de IgG, IgA e imunoglobulina E (IgE) apresentam maiores quantidades no colostro. Elas são importantes mediadoras na regulação das funções imunológicas, contribuindo para a proteção de diversas enfermidades (PERKINS et al., 2014).

Em éguas a concentração de imunoglobulinas no colostro é correlacionada com a densidade, relacionada aos níveis séricos das imunoglobulinas em neonatos (LEBLANC et al., 1986; MASSEY, et al., 1991; RADOSTISTS, 2002). Na avaliação de densidade convencional, um colostro de boa qualidade possui densidade ou gravidade igual ou superior a 1.060, sugerindo que as concentrações de IgG ficam em torno de 3000 mg/dl (LEBLANC et al., 1986; NOGUEIRA & LINS, 2009).

Os eletrólitos de maior concentração no colostro são cálcio (747.7 mg/kg), potássio (928.6 mg/kg), magnésio (139.7 mg/kg) e zinco (2.95 mg/kg). Já é descrito o aumento nos valores de eletrólitos, cálcio e potássio, e redução de sódio e cloro nas secreções da glândula mamária quando pariu 24 horas (CANISSO et al., 2013).

O pH do colostro começa a diminuir quatro dias antes do parto, ocorrendo uma redução significativa do pH das secreções mamárias no dia do parto. O pH do colostro em éguas é menor que 7, geralmente o valor médio de pH no momento do parto de 5,8 a 6,3 (BRASIL et al., 2016). O mecanismo que leva à redução do pH ainda não está elucidado, porém pode estar associado ao aumento da atividade da enzima anidrase carbônica, semelhante ao descrito para bovinos (CANISSO et al., 2013).

3.1.2 Colostro bovino

A espécie bovina tem como característica a placenta do tipo sindesmocorial, constituída por cinco membranas entre a circulação materna e a fetal, permitindo o isolamento e proteção do feto de possíveis microrganismos patogênicos. Entretanto, impede a passagem de componentes vitais, sendo a única forma natural a transmissão via colostro (DAVIS & DRACKLEY, 1998; ROA et al., 2012).

O colostro de bovinos é composto de uma mistura de secreções lácteas e constituintes do soro, principalmente imunoglobulinas, leucócitos maternos, fatores de crescimento, hormônios, citocinas, fatores antimicrobianos não específicos e nutrientes (FOLEY & OTTERBY, 1978; DAVIS & DRACKLEY, 1998; ANDRADE et al., 2010). É conhecido por apresentar características de uma secreção grossa, amarelada e cremosa (WATTIAUX, 1994).

Os leucócitos maternos (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) estão presentes em aproximadamente 1×10^6 leucócitos/mL (LARSON et al., 1980). Em relação aos componentes bioativos do colostro com atividade antimicrobiana incluem-se a lactoferrina, a lisozima e a lactoperoxidase, que são responsáveis por agir como inibidores competitivos pelos sítios de ligação na superfície epitelial do intestino (SUPERTI, 2020).

Outra importante função do colostro é o fornecimento de nutrientes para o metabolismo dos recém-nascidos. O teor médio de sólidos do colostro é de 23,9% e o do leite integral em torno de 12,9%. A maior diferença é encontrada no teor de proteínas (14,0 vezes 3,2%) e também de gordura (6,7 vezes 3,5%), já que a lactose

tem uma concentração maior no leite integral (2,7 vezes 4,8%). Em relação à gordura, é considerada a principal fonte de energia nas primeiras horas de vida, é importante na manutenção e produção da temperatura corporal e ainda fornece ácidos graxos para equilíbrio da glicose (LIERMANN et al., 2020). Apesar da baixa concentração de lactose no colostro bovino, ela apresenta importância para o suprimento de energia (TALUKDER et al., 2002).

Há três tipos de imunoglobulinas presentes no colostro: IgG corresponde a 85-90%, sendo a mais abundante, imunoglobulina M (IgM) e a IgA correspondem a 10-15%. A IgG tem a função principal de reconhecer e tentar eliminar microrganismos patogênicos, a IgM atua como a primeira defesa em casos de septicemia e a IgA é protetora das mucosas, como a parede intestinal, evitando a adesão de possíveis patógenos à mucosa (MARNILA & KORHONEN, 2002).

A concentração de imunoglobulinas é maior no início da lactação e diminui após mamadas sucessivas. A maior absorção coincide com o período de maior qualidade imunológica do alimento, que ocorre nas primeiras 12 horas após o parto (DESBOIS & SMITH, 2010). A imunidade gerada pela ingestão do colostro garante proteção ao animal até que ele próprio produza suas células de defesa, quando seu organismo estiver maduro imunologicamente, o que deve acontecer após 4 a 6 semanas de vida (FRANDSON et al., 2011).

Para que os anticorpos do colostro possam ser absorvidos, há necessidade de oferecer nas primeiras horas de vida. Neste período, ainda não há atividade gástrica, permitindo que os anticorpos não sejam digeridos antes de alcançar o intestino delgado, onde serão absorvidos de maneira intacta. Da mesma forma, em até seis horas após o parto, o intestino tem capacidade máxima de absorção de anticorpos, pois são substâncias de alto peso molecular, necessitando da absorção diferenciada que ocorre pelas microvilosidades intestinais, sendo que este poder de absorção vai decrescendo até 24 horas pós-natal (MORRIL et al., 2012).

3.2 Colostro fermentado anaerobicamente (silagem de colostro)

Algumas situações impedem o consumo do colostro pelo recém-nascido imediatamente após o parto, seja por dificuldade ou incapacidade de ingestão pelo neonato, ou ainda por falha de produção por parte da mãe, necessitando o fornecimento de uma fonte externa de colostro (SAALFELD, 2008). Trabalhos

conduzidos com colostro visam adequar melhores condições de armazenamento, proporcionando a alternativa do colostro *in natura*. Para garantir a administração de quantidades suficientes de imunoglobulinas e alimentação livre de contaminantes, pesquisadores têm recomendado o uso de substitutos comerciais de colostro (FIDLER et al., 2011; GODDEN et al., 2012; PRIESTLEY et al., 2013). Entretanto, nem sempre estes produtos são eficientes na transmissão de anticorpos aos recém-nascidos e representam alterações econômicas significativas nas propriedades.

As formas de armazenamento convencionais são o resfriamento e congelamento. Estes muitas vezes não são tão eficazes, demandam a disponibilidade de equipamentos, energia elétrica nas propriedades ou centros de referência e possuem um período de validade de até 12 meses (GIGUERE & POLKES, 2005; BRASIL et al., 2017). Uma das alternativas de substitutos do leite é o excedente de colostro. O colostro bovino tem boa disponibilidade, fácil armazenamento e baixo valor comercial (PRIESTLEY et al., 2013).

A fermentação e acondicionamento anaeróbico do colostro bovino foi descrita por Saalfeld (2008) como uma nova opção de aproveitamento do excesso de colostro produzido nas propriedades rurais, manutenção da concentração de nutrientes e imunoglobulinas. Ainda apresenta como mais uma vantagem, a ausência de necessidade de resfriamento resolvendo problemas citados na literatura em relação à conservação, armazenamento e qualidade do colostro (FOLEY & OTTERBY, 1978; LANUZA et al., 1990).

A silagem de colostro, assim denominada, possibilitou o armazenamento por períodos superiores a 24 meses, não necessitando de refrigeração, congelamento ou incremento de aditivos, o que contribui para seu baixo custo de produção (SAALFELD, 2012). Dessa forma, é considerada uma forma econômica de se obter um substituto ao leite e colostro de boa qualidade nutricional para bovinos em aleitamento, além de diminuir os custos do produtor na criação desta categoria animal (BATISTA et al., 2016).

A técnica consiste no preenchimento total de garrafas plásticas com colostro, sem espaço para o ar, por um período mínimo de 21 dias. Cuidados de higiene e manejo sanitário correto são essenciais (SAALFELD et al., 2013), pois se empregado erroneamente pode prejudicar as características nutricionais do produto e o desempenho dos animais. Silagens em que a fermentação foi inadequada, o pH não apresentou uma queda efetiva, podendo ser prejudicial para os animais, além de

reduzir o tempo de armazenamento e a qualidade proteica do alimento (AZEVEDO et al., 2013; AZEVEDO & DUARTE, 2014).

Na literatura é descrito que a utilização da silagem de colostro como uma excelente alternativa de fornecer alimento adequado para os neonatos (SAALFELD et al., 2008; SAALFELD et al., 2013, VIRGINIO et al., 2016). Isso ocorre porque a silagem de colostro mantém as características físicas e químicas encontradas no colostro *in natura*, bem como a presença de BAL e outros constituintes colostrais, incluindo as imunoglobulinas. A alimentação dos animais recém-nascidos com a silagem de colostro, em comparação a alimentação com leite, propiciou um ganho de peso maior, tanto em machos como em fêmeas. Quando avaliados os níveis de imunoglobulinas observou-se que não diferiram significativamente entre o colostro *in natura* e a silagem, podendo ser transferidos aos neonatos (SAALFELD et al., 2014). Após 21 dias de fermentação do colostro houve isolamento de BAL que, através da produção de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, inibiram o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (SAALFELD et al., 2013).

3.3 Probióticos

Variadas denominações para o termo probiótico foram estabelecidas no decorrer do tempo de sua utilização. A definição atual, sustentada desde 2013 pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos e, atualmente reconhecida internacionalmente, é a de que probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro e o prebióticos são componentes alimentares não-digeríveis (HILL et al., 2014).

Porém, há exigências a serem cumpridas para que um microrganismo possa ser considerado como probiótico. Conforme a FAO e a OMS (2002) é preciso avaliar sua identidade (gênero, espécie e origem), realizar testes *in vitro* que determinem a resistência do microrganismo frente à acidez gástrica, aos ácidos biliares e às enzimas digestivas, investigar sua atividade contra microrganismos patogênicos, avaliar a segurança de sua administração e proceder com estudos *in vivo* que comprovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

O efeito probiótico de certos microrganismos foi comprovado, destacando os gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium*, e as leveduras

Saccharomyces boulardii e *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente empregados em medicina humana e animal (BUTS & KEYSER, 2006; MARTINS et al., 2010). Com relação aos mecanismos de ação dos probióticos citam-se a inclusão de fatores que fortalecem as defesas naturais do organismo, incluindo a alteração e fortalecimento da microbiota intestinal, produção de compostos com atividade antimicrobiana, inibição da adesão de microrganismos patogênicos e modulação da resposta imune (THOMAS & VERSALOVIC, 2010). Na medicina veterinária os probióticos demonstram benefícios na modulação do sistema imune e na prevenção e tratamento de doenças, principalmente gastrointestinais (WYNN, 2009). Estudos sugerem a necessidade de uma dose apropriada (6 log) dos microrganismos probióticos para que efeitos esperados possam ser expressos no organismo (MINELLI & BENINI, 2008; ROBINSON & FALL, 2012).

De fato, os probióticos tornaram-se bastante populares. Presencia-se o cenário de uma indústria crescente na comercialização de probióticos, em produtos alimentícios, farmacêuticos ou suplementos dietéticos, tanto para uso humano como animal (SANDERS, 2003). Fernandes (2013) explica que os consumidores de alimentos probióticos estão frente ao mercado global crescente.

3.3.1 Mecanismos de ação do probióticos

A presença dos probióticos na microbiota resulta na competição por sítios de ligação e por nutrientes, o que os tornam importantes para manter a microbiota intestinal equilibrada. A característica que os microrganismos probióticos possuem de ocupar sítios de ligação no intestino e formar uma barreira protetora também é fundamental para evitar a colonização por bactérias patogênicas (SCHACHTSIEK et al., 2004; LAVERMICOCCA et al., 2005).

As bactérias presentes no lúmen intestinal têm sua nutrição baseada em substâncias que foram parcialmente digeridas por enzimas ou que foram intencionalmente acrescidas à dieta como prebióticos (GIBSON et al., 2005). Prebióticos referem-se aos elementos alimentares não digeríveis que fomentam seletivamente o desenvolvimento ou ação de populações de bactérias desejáveis no cólon, ocasionando vantagens ao hospedeiro (SAAD, 2006).

Os microrganismos probióticos normalmente tem a capacidade de produzir e liberar moléculas, tais como as bacteriocinas e os ácidos orgânicos, que agem sobre

as bactérias patogênicas promovendo uma ação bacteriostática ou bactericida (VÉLEZ et al., 2007). Bacteriocinas são caracterizadas por serem peptídeos heterogêneos pequenos, resistentes ao calor e que atuam formando um complexo com os componentes da membrana da bactéria alvo, geralmente levando à formação de poros e um efeito detergente (BIERBAUM & SAHL, 2009). Os ácidos orgânicos, especialmente o ácido acético e o ácido lático, apresentam uma potente inibição contra bactérias Gram-negativas, sendo conhecidos como as principais substâncias antimicrobianas produzidas por probióticos que agem causando dano às bactérias patogênicas (MAKRAS et al., 2006). Os ácidos orgânicos na forma não dissociada penetram na célula bacteriana através da sua membrana, dissociando-se no citoplasma e causando uma redução de pH intracelular ou acumulando-se no seu interior de forma ionizada. Esta desestabilização do patógeno acaba resultando em sua morte (RUSSELL & DIEZ-GONZALES, 1998).

3.3.2 Probióticos e resposta imune

Em relação aos mecanismos de ação de imunomodulação dos probióticos, há evidências de que esses microrganismos modulam a resposta imune através da estimulação da produção de imunoglobulinas, indução do aumento da atividade de macrófagos e linfócitos, bem como pelo estímulo da produção de citocinas (PELUSO et al., 2007; WYNN, 2009; OELSCHLAEGGER, 2010). Os efeitos dos probióticos na modulação da resposta imune dependem do microrganismo utilizado (OELSCHLAEGGER, 2010). No intestino, os probióticos interagem com as células epiteliais intestinais e com as células dendríticas (DCs), estimulando a resposta imune inata e adaptativa. Estas células têm a habilidade de reconhecer os probióticos através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs), principalmente os receptores *toll-like* (GÓMEZ-LLORENTE et al., 2010) e a resposta gerada está ligada ao subtipo de células que são ativadas. As células de Paneth ativadas são produtoras de defensinas e as do tipo calciformes intensificam a produção de muco. As DCs quando estimuladas com os probióticos reagem com maior síntese de citocinas, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias capazes de polarizar as respostas dos linfócitos T auxiliares (Th) em Th1, Th2, Tregulador e Th17 (LEBEER et al., 2010).

O gênero *Lactobacillus* estimula as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) a produzirem citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucina (IL) 10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), que induzem a propagação de respostas imunes diferenciadas (SOLIMAN et al., 2015).

A suplementação com determinados probióticos pode ser considerada uma alternativa para aumentar a eficiência de vacinas através da modulação da resposta imune (COPOLLA et al., 2005; PENHA et al., 2011; ROOS et al., 2012). O uso de vacinas é uma alternativa eficiente na profilaxia e controle de doenças infecciosas (MBOW et al., 2010; REED et al., 2009).

Para Almeida et al., (2012) o efeito da suplementação do probiótico na resposta imune humoral em bovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica, com uma dose de 2 mL de vacina antirrábica produzida pelo Instituto Butantan, conclui-se que a vacina antirrábica teve eficiência em produzir e manter a soroconversão nos bovinos primovacinados contra a raiva por 150 dias, porém, a administração de probiótico não interferiu na resposta imune humoral antirrábica. Complementa Ferreira et al. (2009) que a resposta imune humoral antirrábica em bovinos com vacina antirrábica e suplementação com probióticos, também não encontraram diferenças estatísticas significativas entre as médias de concentrações séricas entre os grupos.

Acredita-se que a capacidade dos probióticos em induzir um aumento na resposta imune a vacina seja decorrente da absorção do microrganismo probiótico pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) nas placas de Peyer. A interação de probióticos com APCs ativa linfócitos T virgens, principalmente por meio da secreção de citocinas, em seguida esses linfócitos migram para os linfonodos, em diferentes locais do corpo, onde estimulam a resposta imunológica (HONG et al., 2005; CHIEPPA et al. al., 2006; LEBEER et al., 2010). O mecanismo de modulação imunológica probiótica representa uma alteração do perfil de citocinas produzidas no ambiente, enquanto, os antígenos vacinais irão interagir com as células imunológicas (SHIDA et al., 2011).

3.3.3 Resposta imune

O sistema imunológico é subdividido em dois sistemas, sendo eles: o sistema inato e o adaptativo. No sistema inato é responsável por responder aos estímulos de maneira não específica, e o adaptativo responde ao antígeno de modo específico com memória. A composição de ambos é diferente, no inato tem células de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e células natural killer, e fatores solúveis de sistema complemento, proteínas de fase aguda e enzimas, já o adaptativo tem células: linfócitos T e B e por fatores humorais, as imunoglobulinas (ROSA e VAISBERG, 2002).

O sistema imune é de suma importância para o combate a microrganismos invasores, as células circulam por todo o organismo (sangue, linfa e tecidos) para a ação sistêmica, assim, realizando a ação de eliminar componentes exógenos, além da participação de diversas células e moléculas especializadas e o envolvimento de substâncias como citocinas, mediadores celulares e proteínas. Caso um patógeno ultrapassar as barreiras superficiais e penetrar no organismo, enfrentará uma grande variedade de outros fatores que atuam para defender os tecidos internos (KANDA et al., 2009).

A citocina IL-2 é sintetizada por células T e está envolvida na maturação de linfócitos T e B além de ser crucial na modulação da resposta imune (BAYER et al., 2013). Dessa forma, a IL-2 é uma citocina chave para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, promovendo a proliferação, diferenciação e expansão clonal de células T (ZHOU et al., 2002; GAFFEN & LIU, 2004) e induzindo a geração de células T de memória (BACHMANN & OXENIUS, 2007; LI & PAUZA, 2015).

Os efeitos dessa citocina podem ser efetores ou reguladores e sua ação é determinada pela sua quantificação, uma vez que menores quantidades determinam sua capacidade reguladora, ao passo que maiores quantidades determinam sua atividade efetora (MALEK & BAYER, 2004). Adicionalmente, essa citocina está envolvida na supressão de processos autoimunes, uma vez que responde ao limiar de respostas contra antígenos estranhos (SIM & RADVANYI, 2014).

A IL-4 promove a resposta das células B e a indução da troca do isótipo IgG e IgE (FINKELMAN et al., 1990; PAUL et al., 2010). Também induz a proliferação e ativação de macrófagos e facilita a apresentação de antígenos por meio do aumento da expressão de moléculas de MHC classe II (GORDON & MARTINEZ, 2010). É uma potente citocina reguladora da imunidade, sendo secretada por eosinófilos, mastócitos, basófilos e linfócitos TH2, desempenha importante papel na sobrevivência

de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas, bem como atua para a reparação tecidual e homeostase (FAZEKAS & GROTH, 1992; GEHA et al., 2003; GORDON, 2003; GADANI et al., 2013). Juntamente com IL-10 inibe a ação de fagócitos e suprime o padrão de resposta mediado por TH1, aumentando a resposta mediada por TH2 e ativando a resposta imune humoral (COFFMAN, et al., 2010).

A IL-10 é responsável por aumentar a sobrevivência das células B, bem como a produção de imunoglobulinas, e mediar os efeitos imunoestimulantes nas células T (MOORE et al., 2001).

A IL-17 é produzida por linfócitos T e células NK, sendo responsável por desencadear o processo inflamatório, o que torna a resposta imune das mucosas mais efetiva (WATTEGEDERA et al., 2017; PAPPU et al., 2012). Foi demonstrado que esta citocina não apenas desencadeia a proliferação de linfócitos B, como também promove a formação de centros germinativos e induz a troca de isotipos IgG (MITSDOERFFERA et al. 2010), podendo estar envolvida na indução da produção de anticorpos pelos linfócitos B (CAI et al., 2012; MITSDOERFFER et al., 2010). De acordo com Díaz e Allen (2007) a IL-17 está associada com o desencadeamento de uma resposta TH2 em um estado altamente patológico. Por outro lado, estudos indicam que a IL-17 é importante na manutenção da homeostase intestinal e na regulação das alterações inflamatórias e metabólicas associadas à diabetes do tipo 2 (MORALES et al., 2020).

A ação da IL-17 pode estar associada a formação de barreiras epiteliais na cavidade bucal, na pele, pulmões, trato gastrointestinal e urogenital. Adicionalmente, diversos estudos apontam a IL-17 como uma das principais citocinas envolvidas na resposta imune frente aos probióticos (PAPPU et al., 2012).

Por se tratar de uma área de grande interesse, são muitas as pesquisas e algumas questões vêm sendo elucidadas em relação ao modo de atuação dos probióticos no sistema imunológico. Porém, ainda é preciso muitas pesquisas para estudar o efeito específico de cada microrganismo probiótico, primeiramente com testes *in vitro* e, posteriormente, utilizando modelo animal.

3.4 *Lactocaseibacillus casei*

Lactocaseibacillus casei (*L. casei*) é um Gram-positivo e lactobacilos heterofermentativos facultativos distribuídos em uma variedade de habitats

ambientais, por exemplo: muitos laticínios fermentados, mesa e produtos de cereais, bem como trato gastrointestinal de humanos e animais (FONTANA, ZACCONI e MORELLI, 2018; HILL et al., 2018; ZHENG et al., 2020).

Lactobacillus casei é um grupo composto por espécies de *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*, utilizados para produção de metabólitos bioativos com efeito benéfico aos hospedeiros e poder probiótico (HILL et al., 2018; ZHENG et al., 2020).

Segundo Bharwani et al., (2016) *Lacticaseibacillus casei* é um dos integrantes do microbioma intestinal, junto de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Cândida spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, com a capacidade produzir neurotransmissores, atuando no intestino-cérebro ao modular a expressão de receptores neuroquímicos e apresentando resultados antidepressivos e ansiolíticos.

Para Hill et al., (2018) *L. casei* são estudados por pesquisadores devido aos seus valores industriais e potenciais de promoção da saúde, visto que apresentam contribuições para vários níveis de saúde promovendo atividades, como: capacidade antitumoral, efeitos anti-inflamatórios, e melhoria e regulação da microbiota intestinal (SIDIRA et al., 2010; TIPTIRI-KOURPETI et al., 2016).

4 Artigo**Fermentação anaeróbica do colostro equino**

Carolina Litchina Brasil; Julia de Souza Silveira Valente; Caroline Quintana Braga;
Camila Corrêa Pereira; Ana Munhoz Vianna; Fábio Pereira Leivas Leite; Carlos
Eduardo Wayne Nogueira; Daniela Isabel Brayer Pereira

Publicado na revista Science and Animal Health, v.7, n.1, p. 54-67, 2019.

FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA DO COLOSTRO EQUINO

BRASIL, Carolina Litchina¹;
VALENTE, Julia de Souza Silveira²;
BRAGA, Caroline Quintana³;
PEREIRA, Camila Corrêa⁴;
VIANNA, Ana Munhoz⁵;
LEITE, Fábio Pereira Leivas⁶;
NOGUEIRA, Carlos Eduardo Wayne⁷;
PEREIRA, Daniela Isabel Brayer⁸.

Recebido: 22/01/2019

Aceito: 01/04/2019

¹Médica Veterinária, Mestra, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia/UFPEL; ²Bióloga, Mestra, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia/UFPEL; ³Bióloga, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia/UFPEL; ⁴Química Industrial, Mestra, Doutora, Programa de Pós-Graduação em Química/UFPEL; ⁵Farmacêutica, Mestra, Doutora, Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPEL; ⁶Professor Associado, CDTec/UFPEL; ⁷Professor Associado, Faculdade de Veterinária/UFPEL; ⁸Professora Associada, Instituto de Biologia/UFPEL.

RESUMO

O colostro equino fornece imunoglobulinas, nutrientes e fatores de crescimento essenciais à imunidade e sobrevivência do potro neonato. No entanto, em inúmeros casos, a ingestão do colostro pelo neonato não ocorre de forma natural, sendo necessário o aleitamento artificial. Métodos de preservação do colostro têm gerado resultados controversos. O objetivo deste estudo foi testar a técnica de fermentação anaeróbica do colostro equino, a fim de preservar a qualidade do produto e avaliar, *in vitro*, a manutenção dos constituintes colostrais. Foram verificadas as propriedades microbiológicas, físicas e a concentração de analitos: cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e sódio (Na) do colostro *in natura* e em distintos períodos de fermentação anaeróbica. A avaliação do pH no decorrer da fermentação demonstrou redução condizente com processo fermentativo. Nos distintos períodos de fermentação, foi observada manutenção das concentrações dos analitos e dos níveis de imunoglobulinas. Os resultados deste estudo evidenciam que a silagem do colostro equino mantém as propriedades avaliadas *in vitro*.

Palavras-chave: Silagem. Imunidade. Imunoglobulinas.

INTRODUÇÃO

O colostro equino caracteriza-se como uma secreção láctea do úbere gravídico, que inicia sua liberação lentamente nas últimas semanas de gestação e continua por 24 a 48 horas após o parto. Sua principal função é a transferência passiva de imunoglobulinas maternas para o potro neonato, período de maior suscetibilidade às infecções neonatais, e perdura até o momento em que os animais sejam responsivos aos desafios ambientais (GARDNER et al., 2007).

A espécie equina é dependente da transferência passiva de imunoglobulinas maternas, nutrientes, hormônios e fatores de crescimento presentes no colostro, devendo ser ingerido imediatamente após o nascimento. Essa dependência ocorre, principalmente, pela necessidade de aquisição de imunidade, pois devido ao tipo de placentação na égua (epitélio-corial difusa) não há transferência de moléculas maiores de 150 kDa via transplacentária durante a fase intrauterina do potro. Por isso, os potros nascem sem imunidade humoral, sendo considerados hipoglobulinêmicos ou agamaglobulinêmicos ao nascimento (LEBLANC et al., 1986; SIMON et al., 2012).

Em muitos casos, a oferta do colostro ao neonato não é possível em função da indisponibilidade materna ou por problemas do potro ao nascimento. Nessas situações, a solução mais indicada é o aleitamento artificial, que é uma prática bastante antiga e conhecida entre os médicos veterinários clínicos (GIGUERE; POLKES, 2005).

O colostro pode ser fornecido na sua forma natural, fresco ou conservado. Na equinocultura, a forma de conservação do colostro mais utilizada é o congelamento à temperatura de -20 °C, o qual preserva esse produto por até 12 meses. No entanto, muitas de suas propriedades imunológicas podem ficar comprometidas por fatores como: energia elétrica inconstante, causando descongelamentos indesejáveis, temperatura errônea de descongelamento e material para conservação sem higiene adequada (GIGUERE; POLKES, 2005). Com isso, estudos avaliando alternativas de preservação do colostro equino são necessários e relevantes.

Saalfeld (2008) implementou e avaliou a fermentação anaeróbica de colostro bovino como forma de aproveitamento do excesso de colostro produzido nas propriedades rurais. O

método consistiu na fermentação anaeróbica do colostro. A silagem do colostro bovino não só mantém as características físico-químicas do colostro *in natura*, como também a presença de *Lactobacillus* spp. e outros constituintes, incluindo as proteínas (ANDRADE et al., 2012). Adicionalmente, Saalfeld et al. (2013) comprovaram que os níveis de imunoglobulinas na silagem de colostro bovino são mantidos, sendo transferidas eficientemente para o recém-nascido. Pereira et al. (2016), através da determinação de cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), sódio (Na) e zinco (Zn), em amostras de silagem de colostro bovino, comprovaram que ocorre uma manutenção da concentração dos analitos no colostro, com níveis superiores aos encontrados no leite.

O objetivo deste estudo foi testar a técnica de fermentação anaeróbica do colostro equino, a fim de preservar a qualidade do produto e avaliar, *in vitro*, a manutenção dos constituintes colostrais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 35 éguas prenhes, sendo nove éguas sem raça definida com idade entre sete e vinte e um anos, com média de idade de 16 anos, pertencentes ao Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEP) da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. As demais 26 éguas, da raça Crioula, com idade entre seis e vinte anos, com média de idade de 16 anos, eram provenientes de um criatório situado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul. Todas as éguas tiveram gestações saudáveis, com condições nutricionais e higiênico-sanitárias similares, sendo múltiparas e com média de tempo de gestação de 332 dias. Em todas as fêmeas foi realizado o acompanhamento gestacional, monitoramento e avaliação do parto.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas sob o nº 1890-2016.

Coleta do colostro e preparo da silagem

As coletas de colostro foram realizadas direto da glândula mamária no prazo de até seis horas após o parto. Previamente, foi realizada a antissepsia do úbere, sendo desprezados os primeiros jatos de colostro. Para cada égua foi coletado um volume de 300 mL de colostro, em frascos estéreis tipo Falcon, os quais foram acondicionados em caixas isotérmicas sem a presença de gelo e encaminhados até ao laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pelotas, o tempo de transporte foi em torno de até 60 minutos.

O preparo da silagem de colostro seguiu a metodologia descrita por Saalfeld et al. (2013). Para isso, um volume de 237 mL de colostro foi acondicionado em garrafas de polietileno tereftalato (PET). As garrafas foram completamente preenchidas, fechadas e mantidas em temperatura ambiente por um período de até 365 dias. O volume restante de colostro *in natura* (63 mL) foi utilizado para avaliação das propriedades físicas, microbiológicas, imunológicas e determinação dos analitos. A avaliação dessas propriedades no processo de silagem foi realizada em intervalos de sete dias, nos primeiros 21 dias de fermentação anaeróbica do colostro, e a cada 30 dias até o período final de avaliação.

Avaliação física e pH

Em cada amostra, tanto do colostro *in natura* (n=35) como do colostro fermentado (n=45), foi realizada a avaliação física (aspecto, coloração, viscosidade, odor e sabor) nos períodos de 7, 15, 21, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 365 dias. A viscosidade e coloração foram classificadas de forma subjetiva de 1 a 7 e 1 a 5, respectivamente, segundo descrito por LeBlanc et al. (1986). O pH foi determinado com auxílio de um potenciômetro digital devidamente calibrado. Adicionalmente à avaliação física, incluiu-se odor e sabor, essas características são descritas para o colostro e silagem de bovinos por Saalfeld (2008).

Avaliações microbiológicas

Alíquotas de 100 µL das amostras de colostro *in natura* e de silagem de colostro foram semeadas em meios de cultura MacConkey, Chapmann, Sabouraud e ágar sangue ovino 5%. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em aerobiose. Paralelamente um volume de 100 µL de colostro *in natura* e silagem de colostro foram semeados em 9 mL de caldo Man,

Rogosa e Sharpe (MRS-Biobras, Brasil) incubado a 37 °C por 72 horas em microaerofilia e anaerobiose. Posteriormente, alíquotas de 100 µL dessa cultura foram repicadas para placas de Petri contendo ágar MRS, sendo incubadas nas mesmas condições citadas acima.

As placas que apresentaram crescimento de colônias bacterianas foram avaliadas pela coloração de Gram e submetidas à identificação bioquímica até o nível de gênero (BARENFANGER, 2003). Para identificação molecular, foi realizada extração total de DNA com pérolas de vidro, em amostras de silagem de colostro de distintos períodos, através do método adaptado de Chagnaud et al. (2001) e amplificação por PCR utilizando os *primers* que amplificam a região 16S.

Determinação de analitos

Os analitos determinados foram Ca, K, Mg e Na. Foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) da Agilent, modelo 4200 (Melbourne, Austrália), equipado com um nebulizador OneNeb e uma câmara de nebulização ciclônica do Laboratório de Metrologia Química da Universidade Federal de Pelotas. A análise foi realizada para o colostro *in natura* e silagens de colostro até 365 dias. O plasma foi mantido com gás nitrogênio, obtido do ar atmosférico através de um gerador de nitrogênio da Agilent, modelo 4107 (Melbourne, Austrália), com vazões de 20 e 1,5 L/min para o gás de plasma e auxiliar, respectivamente.

Para o preparo das amostras foi utilizada uma solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), a qual consistiu em pipetar 150 µL de amostra de colostro *in natura* e colostro fermentado diretamente em frascos de polipropileno (PP), sendo, logo em seguida, adicionado 300 µL de TMAH 25% (m/v) (Sigma, Estados Unidos). As amostras foram agitadas e permaneceram *overnight* a temperatura ambiente. Por fim, foram avolumadas a 2 mL com água deionizada.

Quantificação de imunoglobulina G

A detecção de imunoglobulinas no colostro e silagem do colostro foi realizada empregando o método de ELISA (ensaio imunoenzimático) indireto para detecção de IgG anti *Theileria equi* (VIANNA et al., 2014). Essa avaliação foi realizada em amostras de colostro de nove éguas

inoculadas com uma vacina experimental contra *T. equi* (VIANNA et al., 2014). Seis éguas não vacinadas foram utilizadas como controle.

A avaliação das imunoglobulinas no processo de fermentação da silagem foi realizada em períodos de sete dias, nos primeiros 21 dias de fermentação anaeróbica do colostro, e a cada 30 dias até o período final de avaliação, totalizando 365 dias de fermentação.

Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada através do software SAS. Para avaliação física foi realizada distribuição de frequência para descrições das características físicas de viscosidade e coloração, sendo os valores expressos em porcentagem, mínimo e máximo.

Para avaliação das diferenças nos valores de pH, determinação dos analitos e dinâmica de IgG em relação ao tempo de fermentação, as variáveis foram submetidas ao teste de Bonferroni, e realizadas pressuposições para análise de variância. A partir dos dados não-normais, foi realizada transformação logarítmica. As variáveis não-normais (K, Mg e Na) foram convertidas em logaritmo base 10 (log 10), passando a demonstrar normalidade. Significância foi atribuída ao valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O colostro manteve as características avaliadas, sendo de grande importância na alimentação dos potros neonatos, entretanto, o tempo de secreção dessa substância após o parto é muito curto e muitas vezes os potros não conseguem aproveitar totalmente o período de produção desse alimento. Esse fato justifica a necessidade de coletar e estocar o colostro para ser administrado na alimentação diária dos potros neonatos, como um suplemento alimentar. Todavia, é importante preservar os constituintes colostrais para que não se percam as propriedades nutritivas e imunológicas (CANISSO et al., 2013).

Avaliação Física

O colostro equino *in natura* (n=35) caracterizou-se por apresentar viscosidade leitosa (11/35), cremo-leitosa (5/35) e cremosa (19/35). Em relação a coloração: amarelo claro (21/35) e amarelo escuro (14/35). A silagem do colostro fermentada foi avaliada fisicamente, nas quais não foram observadas modificações de coloração e viscosidade. Adicionalmente à

avaliação física das amostras de silagem de colostro, incluiu-se odor e sabor, em que o odor se apresentou semelhante a queijo com sabor ácido e levemente salgado. Os resultados da avaliação de viscosidade e coloração do colostro *in natura* foram similares aos descritos por Luz et al. (1992), que evidenciaram a relação entre coloração, viscosidade e o teor de imunoglobulinas, sendo um método subjetivo. No presente estudo, pode-se observar que a avaliação física do colostro *in natura* e silagem do colostro apresentaram boa qualidade, refletindo indiretamente o teor de imunoglobulinas, uma vez que quanto maior a coloração e viscosidade maior a concentração de imunoglobulinas. A manutenção das características físicas da silagem indicou adequada fermentação das amostras avaliadas, demonstrando a viabilidade do método até 365 dias de fermentação.

Avaliação do pH

A média do pH do colostro *in natura* foi de 6,17. A partir do sétimo dia de avaliação da silagem de colostro até os 365 dias, os valores de pH diferiram da avaliação inicial, sendo a média 3,83. Essa redução do pH ($p < 0,005$) durante os períodos avaliados demonstrou adequado processo fermentativo. Os valores de pH no colostro *in natura* e silagens apresentaram valores similares aos descritos por Saalfeld et al. (2013) para silagem de colostro bovino, na qual também se observou redução constante do pH, quanto maior o período de fermentação. A redução do pH observada durante os períodos avaliados demonstrou adequado processo fermentativo, no qual houve conversão de lactose em ácido láctico, influenciando diretamente as características biológicas e impedindo o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e de deterioração (SAALFELD et al., 2013).

Tabela 1 - Valores de pH no colostro *in natura* e nos distintos períodos de fermentação anaeróbica.

Momento (dias)	pH
Parto	6,19±0,07 ^a
7	5,08±0,17 ^b
15	4,78±0,25 ^{b,c}
21	4,54±0,11 ^{c,d}
30	4,08±0,08 ^{d,e}
60	3,92±0,05 ^{e,f}
90	3,58±0,13 ^{f,g}
120	3,82±0,15 ^{e,f,g}
150	3,40±0,17 ^g
180	3,46±0,10 ^{f,g}
365	3,46±0,10 ^{f,g}

^{a,b,c,d,e,f,g} Letras diferentes indicam diferença estatística entre as variáveis na coluna (p<0,05).

Analitos

Os analitos Ca, K e Na não demonstraram alterações durante a fermentação. Os valores de Mg demonstraram interação fraca ($r=0,307$) com o tempo de armazenamento decorrido, apresentando um discreto aumento na concentração ($510,20 \text{ mg.L}^{-1}$) no decorrer dos 365 dias de fermentação, em comparação com o colostro *in natura*, que apresentou a concentração de $300,20 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 1). As determinações de Ca, K e Na mantiveram-se semelhantes aos valores encontrados no colostro *in natura* até 365 dias de fermentação (Tabela 2), estando as concentrações desses analitos de acordo com os padrões descritos para equinos da raça Árabe (UNANIAN et al., 1994). Porém, não há descrição das concentrações desses analitos na fermentação anaeróbica do colostro equino. A manutenção das concentrações neste estudo, observadas na silagem do colostro, sugerem que o processo de fermentação pode ser utilizado para o armazenamento de colostro equino. Contudo, mais estudos são necessários para sugerir a administração do colostro fermentado para o aleitamento de potros neonatos. A quantificação dos analitos na

secreção mamária pode ser utilizada para prever o parto em gestações saudáveis, pois ocorre um incremento nas concentrações de Ca e K e um decréscimo nas concentrações de Na e Cloro (Cl), no período entre o dia anterior e dia do parto (CANISSO et al., 2013). Dessa forma, a avaliação dos analitos nesse período e no colostro *in natura* pode estimar se houve a formação adequada do colostro. Entretanto, não há descrição da relação dos níveis de eletrólitos no colostro *in natura* com a qualidade do mesmo.

Tabela 2 - Resultados da média $\pm$ desvio padrão da concentração de Ca, Mg, K e Na no colostro *in natura* e nos distintos períodos de fermentação anaeróbica.

Momento (dias)	Concentração (mg.L ⁻¹)			
	Ca	Mg	K	Na
Parto	788,97 $\pm$ 31,66	300,20 $\pm$ 34,42	1365,9 $\pm$ 50,71	344,31 $\pm$ 28,76
7	785,60 $\pm$ 68,30	373,60 $\pm$ 98,82	1378,8 $\pm$ 77,24	386,60 $\pm$ 84,27
15	787,00 $\pm$ 68,43	364,20 $\pm$ 96,17	1314,4 $\pm$ 89,30	376,00 $\pm$ 78,08
21	741,20 $\pm$ 74,37	357,80 $\pm$ 95,79	1237,0 $\pm$ 97,14	324,40 $\pm$ 92,27
30	651,80 $\pm$ 35,36	340,40 $\pm$ 105,41	1333,0 $\pm$ 96,16	371,00 $\pm$ 61,63
60	662,40 $\pm$ 41,05	370,00 $\pm$ 116,15	1358,0 $\pm$ 91,45	343,80 $\pm$ 56,95
90	631,20 $\pm$ 35,99	328,80 $\pm$ 113,34	1244,8 $\pm$ 81,69	336,00 $\pm$ 58,57
120	726,60 $\pm$ 59,30	484,80 $\pm$ 69,96	1439,2 $\pm$ 226,18	462,00 $\pm$ 85,22
150	786,40 $\pm$ 43,58	510,00 $\pm$ 71,33	1369,6 $\pm$ 251,58	463,00 $\pm$ 85,08
180	782,20 $\pm$ 40,24	510,20 $\pm$ 71,78	1314,0 $\pm$ 229,50	443,00 $\pm$ 80,20
365	782,50 $\pm$ 40,24	510,30 $\pm$ 71,78	1314,0 $\pm$ 209,50	443,00 $\pm$ 80,20

Quantificação de imunoglobulina G

A dinâmica da IgG da silagem de colostro se manteve nos períodos avaliados e não demonstrou diferença quando comparada ao colostro *in natura*. Os níveis dessa imunoglobulina se mantiveram constantes durante os 365 dias de fermentação. Esses resultados demonstraram que a silagem do colostro equino, assim como nos bovinos, constitui-se como um método alternativo de armazenamento para a formação de bancos de

colostro. Entretanto, é necessária a realização de testes *in vivo*, a partir do fornecimento para potros neonatos e posterior avaliação de absorção de imunoglobulinas. Segundo SIMON et al. (2012), uma característica da espécie equina é a ausência de imunidade humoral ao nascimento, o que justifica a importância do colostro como método de imunização passiva.

Avaliação microbiológica

Na cultura microbiológica foi observado crescimento bacteriano em somente 5,7% (2/35) das amostras de colostro *in natura* e 11,1% (5/45) das silagens. Baseado na identificação morfológica, bioquímica e molecular, foram classificadas como pertencentes aos gêneros *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. (Figura 1). Apesar do pouco crescimento observado, macroscopicamente nos cultivos, a presença bacteriana no colostro *in natura* e na silagem foi confirmada pela identificação molecular. Similarmente, Saalfeld et al. (2013) ao avaliarem a silagem de colostro bovino, observaram a predominância de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* e *Enterococcus*), sugerindo que esses gêneros bacterianos foram os responsáveis pelo processo de fermentação do colostro. Segundo esses autores, bactérias do grupo ácido-lático possuem propriedades probióticas, podendo ser usadas em alimentos tanto para consumo humano quanto animal, as quais acidificam esses alimentos, impedindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas. De acordo com Salimei e Fantuz (2012), em equinos a microbiota com maior representatividade no colostro é de bactérias ácido-láticas, porém, a caracterização das espécies não é descrita.

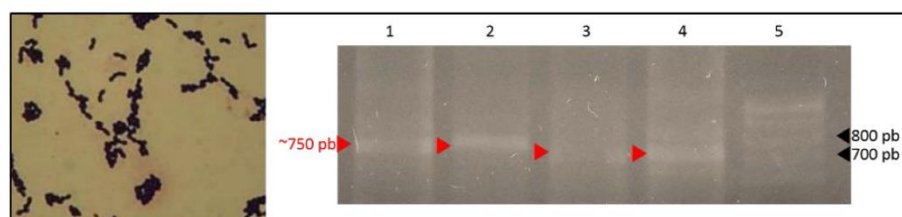


Figura 1 - *Enterococcus* spp. (coloração de Gram) à esquerda. Gel de agarose 1% para eletroforese da PCR realizada sobre amostra total de silagem de colostro armazenada por diferentes períodos de fermentação à direita. Linha 1 – colostro “*in natura*”; Linha 2 – 21 dias; Linha 3 – 60 dias; Linha 4 – 180 dias; Linha 5 – Marcador 100 pb (Ludwigui).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a fermentação anaeróbica do colostro equino, até 365 dias de fermentação, manteve os constituintes colostrais avaliados semelhantes ao colostro *in natura*. Os dados permitem inferir que essa técnica demonstrou ser um método econômico, de fácil produção e armazenamento, dispensando equipamentos especiais para sua elaboração. Assim, o colostro anaerobicamente fermentado até 365 dias pode ser um novo método de armazenamento para elaboração de um banco de colostro equino. Entretanto, estudos *in vivo* são necessários para viabilizar o seu emprego na equideocultura.

ANAEROBIC FERMENTATION OF EQUINE COLOSTRUM

ABSTRACT

Equine colostrum provides immunoglobulins, nutrients, and growth factors essential to the immunity and survival of the newborn foal. However, in many cases, colostrum intake by the neonate does not occur naturally, and artificial feeding is necessary. Colostrum preservation methods have generated controversial results. The objective of this study was to test the anaerobic fermentation technique of equine colostrum in order to preserve the quality of the product and to evaluate the maintenance of colostrum constituents *in vitro*. The microbiological and physical properties and the concentration of analytes, Ca, K, Mg, and Na of colostrum *in natura* and in different periods of anaerobic fermentation were verified. The evaluation of the pH during the fermentation showed a consistent reduction with the fermentative process. In the different fermentation periods, maintenance of analyte concentrations and immunoglobulin levels was observed. The results of this study show that equine colostrum silage maintains the properties evaluated *in vitro*.

Keywords: Silage. Immunity. Immunoglobulins.

FERMENTACIÓN ANAERÓBICA DEL CALOSTRO EQUINO

RESUMEN

El calostro equino proporciona inmunoglobulinas, nutrientes y factores de crecimiento esenciales para la inmunidad y la supervivencia del potro neonato. Sin embargo, en innumerables casos la ingestión del calostro por el neonato no ocurre de forma natural, siendo necesario la lactancia artificial. Los métodos de preservación del calostro han generado resultados controvertidos. El objetivo de este estudio fue probar la técnica de fermentación anaeróbica del calostro equino a fin de preservar la calidad del producto y evaluar *in vitro* el mantenimiento de los constituyentes calostrales. Se verificaron las propiedades microbiológicas y físicas y la concentración de analitos, Ca, K, Mg, y Na del calostro *in natura* y en distintos períodos de fermentación anaeróbica. La evaluación del pH en el transcurso de la fermentación demostró una reducción acorde con el proceso fermentativo. En los distintos períodos de fermentación, se observó el mantenimiento de las concentraciones de los analitos y de los niveles de inmunoglobulinas. Los resultados de este estudio evidencian que el ensilaje del calostro equino mantiene las propiedades evaluadas *in vitro*.

Palabras clave: Ensilaje. Inmunidad. Inmunoglobulinas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES Código de financiamento 001).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. A. P.; BORGER, I.; ALVES, L. R. N.; et al. Silagem de colostro na alimentação de ruminantes. **Nutritime**, v. 9, p. 1816-1830, 2012. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/artigo%20165_.pdf>.

BARENFANGER, J. Improving the clinical utility of microbiology data: an update. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2003.

CANISSO, I. F.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H.; et al. Decreasing pH of mammary gland secretions is associated with parturition and is correlated with electrolyte concentrations in prefoaling mares. **Veterinary Record**, v. 173, n. 9, p. 218, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.101658>

CHAGNAUD, P.; MACHINIS, K.; COUTTE, L. A.; et al. Rapid PRC-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 139-148, 2001. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00244-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00244-x)

GARDNER, R. B.; NYDAM, D. V.; LUNA, J. A.; et al. Serum opsonization capacity, phagocytosis, and oxidative burst activity in neonatal foals in the intensive care unit. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 797-805, 2007. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03024.x>

GIGUERE, S.; POLKES, A. C. Immunologic disorders in neonatal foals. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 21, n. 2, p. 241-272, 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2005.04.004>

LEBLANC, M. M.; MCLAURIN, B. I.; BOSWELL, R. Relationship among serum immunoglobulin concentration in foals, colostral specific gravity, and colostral immunoglobulin concentration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 57-60, 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733502>> .

LUZ, I. N. C.; ALDA, J. L.; SILVA, J. H. S.; et al. A Viscosidade, A Coloração e a Gravidade Específica do Colostro no Prognóstico da Concentração de Imunoglobulina Sérica de Potros Recém-Nascidos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 3, p. 299-305, 1992. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781992000300009>

PEREIRA, C. C.; VITOLA, H. R. S.; SOUZA, A. L.; et al. Decomposition method in semi-closed system with cold finger for evaluation of Ca, K, Mg, Zn and Fe in colostrum silage by F AAS and F AES. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 293-296, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.012>

SAALFELD, M. H. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. **A Hora veterinária**, v. 162, p. 59-62, 2008.

SAALFELD, H. M.; PEREIRA, D. I. B.; SILVEIRA, K. R. K.; et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1636-1641, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000900016>

SALIMEI, E.; FANTUZ, F. Equid milk for human consumption. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 130-142, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.008>

SIMON, B. B. Z.; RONCATI, N. V.; HOGE, A. Y. A.; et al. Perfil Celular do Colostro de Éguas: Estudo Preliminar. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 10, n. 2-3, p. 32–36, 2012. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-de-educacao-continuada-em-medicina-veterin/10-\(2012\)-2-3/perfil-celular-do-colostro-de-eguas-estudo-preliminar/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-de-educacao-continuada-em-medicina-veterin/10-(2012)-2-3/perfil-celular-do-colostro-de-eguas-estudo-preliminar/)> .

UNANIAN, M. M.; SILVA, A. E. D. F.; PEREIRA, A. C. Colostro de égua no aleitamento artificial. (EMBRAPA-CPPSE). **Circular Técnica São Carlos: EMBRAPA - CPPSE**, v. 8, p. 21, 1994.

VIANNA, A. M.; GONÇALES, R. A.; LARA, A. P. S. S.; et al. Expressão heteróloga da EMA-2 (equi merozoite antigen) de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* com potencial utilização em imunobiológicos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1830-1836, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131003>

Autor para correspondência:

Carolina Litchina Brasil.

Avenida Pinheiro Machado, n. 506, apto. 301 I, Fragata, Pelotas/RS, CEP: 96.040-500.

carolinalitchinabrasil@hotmail.com

5 Manuscritos

5.1 Manuscrito 1

***In vitro* probiotic properties of *Lactocaseibacillus casei* P054 isolated from colostrum and bovine colostrum silage**

Carolina Litchina Brasil; Júlia de Souza Silveira Valente; Juliana Marques; Vitória Sequeira Gonçalves; Renata Nobre da Fonseca; Caroline Quintana Braga; Mara Helena Saalfeld; Fábio Raphael Paschoti Brhun; Fábio Pereira Leivas Leite; Daniela Isabel Brayer Pereira

Submetido à revista Process Biochemistry, Qualis CBIII - B1

Biotechnology Reports

In vitro probiotic properties of *Lactobacillus casei* P054 isolated from colostrum and bovine colostrum silage

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BTRE-D-20-00031
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Bovine, Colostrum silage, Probiotic, Immunity.
Corresponding Author:	Carolina Litchina Brasil BRAZIL
First Author:	Carolina Litchina Brasil
Order of Authors:	Carolina Litchina Brasil Júlia de Souza Silveira Valente Vitória Sequeira Gonçalves Renata Nobre da Fonseca Caroline Quintana Braga Mara Helena Saalfeld Fábio Raphael Paschoti Brhunc Fabio Pereira Leivas Leite Daniela Isabel Brayer Pereira
Abstract:	Probiotics are defined as microorganisms capable of enhancing the organism's natural defenses against pathogens. In this study, the in vitro probiotic potential of <i>L. casei</i> P054 isolated from bovine colostrum silage was evaluated, as well as the tolerance to adverse gastrointestinal tract conditions. Antagonistic activities against pathogenic bacteria, susceptibility to different antimicrobials, simulated self-aggregation capacity, cytotoxicity and hemolytic activity were also evaluated. Results showed that tolerated several adverse conditions without reducing cell proliferation. No hemolytic activity was detected, and no cytotoxic effects were observed in mammalian cells. The isolate also showed antagonistic activity to tested pathogens and was sensitive to 90% of evaluated antimicrobials. Survived simulations of the gastrointestinal condition when in the presence of food, and showed self-aggregation and coaggregation capacity. Results obtained suggest relevant in vitro probiotic potential. However, in vivo studies are needed to verify its beneficial health activity and validate its applicability as a probiotic.
Suggested Reviewers:	Mateus Matiuzzi universidade federal do vale do são francisco

	mateus.costa@univasf.edu.br excellent teacher and researcher
	Maria Isabel Azevedo Universidade Federal de Minas Gerais beelazevedo@gmail.com excellent teacher and researcher
	Rodrigo Casqueiro Universidade Federal de Pelotas rodrigocunha_vet@hotmail.com excellent teacher and researcher
	Paulo Ricardo Rodrigues Universidade Federal de Pelotas sabotte20@gmail.com excellent teacher and researcher
Opposed Reviewers:	

“Highlights”

- L. casei P054 is able to tolerate several adverse conditions without reducing cell proliferation.
- L. casei P054 has no hemolytic activity
- L. casei P054 has no cytotoxic effect on mammalian cells.
- L. casei P054 has antagonistic activity to the pathogens tested.
- L. casei P054 survives simulations of the gastrointestinal condition when in the presence of food and has the capacity for self-aggregation and co-aggregation.

Figura 1 – Highlights

Fonte: realizado pela autora.

[Click here to access/download;Graphical Abstract;GRAPHICAL ABSTRACTR0.jpg](#)

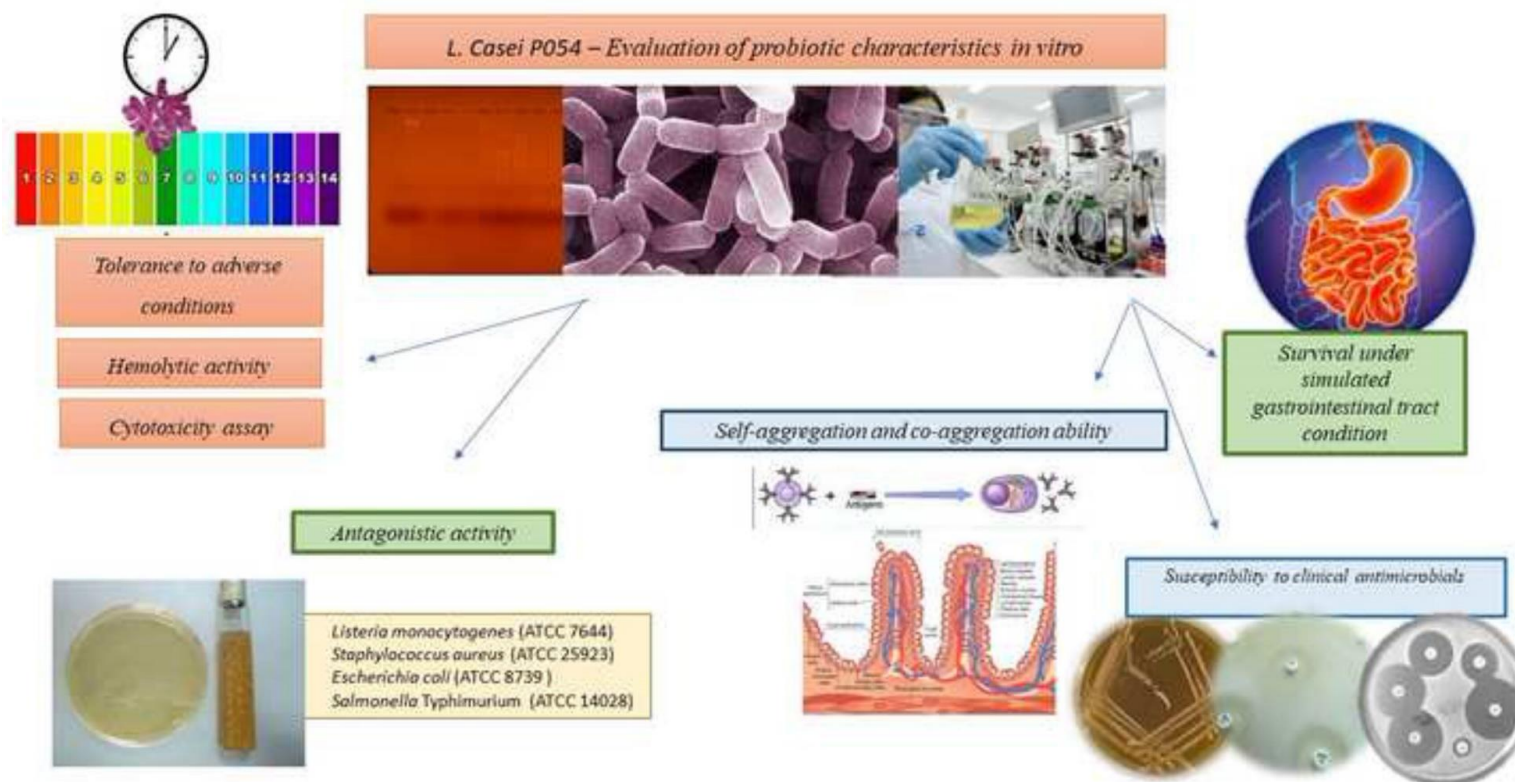


Figura 2 - *L. casei* P054
 Fonte: realizado pela autora.

***In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus casei* P054 isolated from
colostrum and bovine colostrum silage**

Carolina Litchina Brasil¹, Juliana Marques², Vitória Sequeira Gonçalves², Renata
Nobre da Fonseca², Caroline Quintana Braga¹, Mara Helena Saalfeld², Fábio
Raphael Paschoti Brhun³, Fábio Pereira Leivas Leite², Daniela Isabel Brayer Pereira¹

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas, Brazil

² Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas 96160-900 Capão do Leão RS, Brasil;

³ Department of Preventive Veterinary, Zoonosis Control Center, Universidade Federal
de Pelotas, Pelotas, Brazil

Correspondence

Daniela Isabel Brayer Pereira, Department of Microbiology and Parasitology,
Universidade Federal de Pelotas, Travessa Andre Dreyfuss, s/n, Prédio 18, Campus
Universitário Capão do Leão, CEP 96160000, Pelotas, Brazil. E-mail:
danielabrayer@gmail.com.br

Abstract

In this study, we evaluated the probiotic potential in vitro of *Lactobacillus casei* P054. We verified the tolerance to adverse conditions of survival, and the gastrointestinal tract. In addition, antagonistic activities against pathogenic bacteria (Gram-positive and Gram-negative), susceptibility to importance in medical or veterinary clinic, simulated self-aggregation and co-aggregation ability, cytotoxicity test and hemolytic activity were evaluated. No hemolytic activity was detected, and no cytotoxic effects were observed in mammalian cells. *L. casei* P054 tolerated several adverse conditions without reducing cell proliferation, It was observed that the survival rate of *L. casei* P054, when submitted to different acidic conditions (pH 2, pH 2.5, and pH 2.5 with pepsin), bile salt concentrations (0.3% and 0.1%), and 0.4% phenol, isolate evaluated did not meaningful reduce its multiplication, as shown in. The isolate also showed antagonistic activity to the pathogens tested and was sensitive to all antimicrobials except sulfonamide. He survived simulations of the gastrointestinal susceptible when in the presence of food and showed self-aggregation and coaggregation ability. However, in vivo studies are needed to verify its beneficial health activity and validate its applicability as a probiotic.

Keywords: anaerobically fermented, probiotic, ruminant, immunity.

1. Introduction

Among the microorganisms classified as probiotic are prokaryotes of the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus*, which are characterized by the production of lactic acid. Lactic acid bacteria (LAB) have similar morphological, metabolic, and physiological characteristics and are the most representative class of probiotic microorganisms (Iyer and Tomar, 2009).

The mechanisms of action of probiotics comprise enhancing natural defenses, including by altering the intestinal microbiota, strengthening, and modifying the intestinal barrier, producing of antimicrobial compounds, inhibiting pathogen adhesion and modulating the immune response (Thomas and Versalovic, 2010). These characteristics allow BAL to be utilized as probiotics, which are food supplements that contain microorganisms and that, in certain doses, may benefit hosts health (Borchers et al., 2009; Rossi et al., 2011). Lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* species, have been isolated from a variety of foods, such as miso, milk or their derivatives (Iyer and Tomar, 2009).

Studies show that health professionals have used colostrum as a food supplement in order to strengthen immune systems in healthy individuals and those with chronic diseases (Pakkanen and Aalto, 1997). According to Van Hooijdonk et al. (2000), bovine colostrum is much more beneficial to human health than human colostrum, because the bovine bed has a higher concentration of IgG. In fact, countries including Norway, Finland, Canada, and Australia use colostrum as a food supplement and medicinal product. Colostrum is also an important dietary supplement for athletes as increases desired effects of exercise by boosting strength and endurance, assisting in burning fat, and increasing muscle mass (Godhia and Pathel, 2013).

Bovine colostrum anaerobically fermented (colostrum silage) maintains physicochemical characteristics, constituents of colostrum *in natura*, as well as the concentration of immunoglobulins. Therefore, it is considered suitable for use as animal feed (Saalfeld et al., 2013, 2014). Additionally, microbiological evaluations of colostrum and bovine colostrum silage revealed that after 21 days of fermentation, bacteria pathogenic to animal health were not detected and the only remaining viable prokaryotes were LAB, including *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp., with possible probiotic potential (Saalfeld et al., 2013; Saalfeld et al., 2016). Nonetheless, these authors did not evaluate the probiotic activity *in vitro* and *in vivo* of these microorganisms. Afterward, Vitola et al. (2018) confirmed the *in vitro* probiotic potential of an isolate of *L. casei* from bovine colostrum silage and suggested its safety for consumption.

This study aimed to evaluate the *in vitro* probiotic potential of *Lactobacillus casei* (*L. casei*) P054 from colostrum and bovine colostrum silage.

2. Material and methods

2.1 Microorganism

Lactobacillus casei P054 used in the present study was previously isolated from bovine colostrum silage by Saalfeld et al. (2013). This microorganism was characterized according to its physiological, morphological and biochemical characteristics and partial sequence of the 16S rDNA region (Saalfeld, 2013). It belongs to the collection of cultures of the Microbiology Laboratory of the University Federal of Pelotas (UFPel).

2.2 Evaluation of probiotic characteristics *in vitro*

2.2.1 Tolerance to adverse conditions

The tolerance of the isolate to different acidic conditions (pH 2.0, pH 2.5, pH 2.5 + 3 mg.mL⁻¹ of pepsin - Sigma®) and bile salt concentrations (0.3% and 0.1%) was evaluated according to the protocol described by Perelmutter et al. (2008). Tolerance of the presence of 0.4% phenol was also verified, testing for the resistance to phenol may generate further information on the potential for survival of lactobacilli in gastrointestinal conditions (Pinto et al., 2006). Results were evaluated by counting viable cells after 0 h and 4 h of incubation at 37 °C in Petri dishes containing De Man, Rogosa and Sharpe (MRS®) agar (Merck, Darmstadt, Germany). The percent survival of *L. casei* was calculated based on the number of viable cells at 4 h of incubation relative to viable cell counts at 0 h of incubation.

2.2.2 Survival of the simulated gastrointestinal tract

Lactobacillus casei P054 survival in the simulated gastrointestinal tract was evaluated following Huang and Adams (2004) with modifications. Viable cell counts in simulated gastric juice (with pepsin, pH 2.0) were performed at 0, 15, 30, 60, 120, 180 and 240min of incubation at 37°C. Simulated gastric juices were prepared by suspending pepsin (1:10000, ICN) in sterile saline (0.5% w/v) to a final concentration of 3 g l⁻¹ and adjusting the pH to 2.0, 3.0, and 4.0 with concentrated HCl or sterile 0.1 mol l⁻¹ NaOH using a pH meter (Model 8417N, Hanna Instrument, Singapore). The effect of different pH of simulated gastric juices on the viability of 13 dairy propionibacteria strains during 180-min simulated gastric transit. There was no loss of viability for all strains at pH 4.0; in contrast, at pH 3.0, 10 strains retained the same level of viability, while at pH 2.0, all strains showed reduced viability. Viable cell counts in simulated intestinal juice (with pancreatin, 0.5% bile salts, pH 8.0) were performed at 0 and 240 min of incubation at 37°C. To evaluate the influence of food on survival of the *L. casei* P054 in the simulated gastrointestinal tract, 0.85% saline was replaced by skim milk (Elegê®).

2.2.3 Antagonistic activity

Antagonistic activity was evaluated using the spot-on-the-lawn technique (Fleming et al., 1975) against Gram-negative and Gram-positive. *Lactococcus lactis*

subsp. lactis Dy 13 was used as a positive control. Results were obtained by inhibition halo measurements.

2.2.4 Susceptibility to clinical antimicrobials

Antimicrobial susceptibility was evaluated using the agar diffusion technique following the protocol from the Clinical and Laboratory Standards Institution (CLSI, 2017). Antimicrobial disks (Laborclin®, Brazil) used contained ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), penicillin G (10 µg), sulfonamide (300 µg), tetracycline (30 µg), vancomycin (30 µg), streptomycin (30 µg), or ampicillin (10 µg).

Results were determined by measuring of the inhibition halos and were characterized as resistant, intermediate, and susceptible following the CLSI (2017) standard for Gram-positive bacteria.

2.2.5 Self-aggregation and co-aggregation abilities

Self-aggregation and co-aggregation abilities were evaluated as described by Collado et al. (2008). The results of both tests were expressed in percentages. To assess co-aggregation ability, the pathogen *Listeria monocytogenes* Scott A was used. Tests were performed under the following conditions: temperatures of 20 °C or 37 °C and for 2, 4, 20 and 24 h.

2.2.6 Hemolytic activity

The hemolytic activity was determined by cultivating *L. casei* P054 in MRS broth for 24 hours at 37°C, microaerophilic conditions. After activation in MRS broth, the isolate was transferred to Trypticase Soy agar (TSA) (Himedia, India), previously supplemented with 7% defibrinated equine blood. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 was used as positive control. After incubation for 48 hours at 37°C, the hemolytic reaction was evaluated by observing both the partial lysis of red blood cells (α -hemolysis), through the appearance of green zones around the colonies, as well as total lysis (β -hemolysis), through the appearance of transparent zones (Haldler et al., 2017).

2.2.7 Cytotoxicity assay

The cytotoxicity was analyzed in MDBK (Madin Darby bovine kidney) line from the cell bank of the Laboratory of Virology and Immunology of the School of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Pelotas. The assay was carried out according to Plumb (2004), with modifications. Briefly, 100 µl of MDBK cells were cultured (10^5 cells/mL ou cells/well) in E-MEM (eagle minimum essential media) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) in 96-well microplates. After 24 hours in a bacteriological incubator at 37°C with 5% CO₂ and approximately 90% confluence, the medium was drained, and *L. casei* P054 was added at concentrations from 10^3 to 10^9 CFU/mL. Control cells were kept only in E-MEM 1mg/ml in PBS; 50 µl/well. After incubation for 8, 12, 24, 32, 36 and 48 hours under the same conditions, 50 µl of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solution (1mg/ml in PBS; 50 µl/well) was added to each well and incubated at 37°C for 3-4 hours. After removal of the cell supernatant, the crystals were solubilized by the addition of DMSO (Dimethyl sulfoxide, 100 µl/well) and shaken. The absorbance was determined at a 570 nm wavelength. The percentage of cell viability was calculated using the following formula: % viable cells = (abs sample – abs blank) \ (abs control – abs blank) x 100 (abs sample = Well sample absorbance; abs blank = Blank well absorbance (well containing only medium); abs control = control absorbance x 100 = to stay in percentage) (Meerlo et al. 2011).

2.2.8 Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 20.0 software. Initially, data were analyzed with the Shapiro-Wilk normality test. Evaluation of antagonistic effects of probiotics on pathogenic bacteria was carried out using the Kruskal-Wallis test. Gastrointestinal transit tolerance data were analyzed using ANOVA. The tests were applied based on number of replicates and time points and using presence or absence of food as independent variables. We tested the following assumptions about endogenous variables included in models in each of our data sets: error normality using the Shapiro-Wilk test, homoscedasticity using Levene's test, and sphericity using the Mauchly test (Pestana and Gageiro, 2008). We then performed GLM analysis. In cases where no sphericity was observed, corrections were made using the Huynh-Feldt epsilon F tester Greenhouse-Geiser criterion. To evaluate self-aggregation and co-aggregation capacities, the temperature and multiplication time of the isolate was

analyzed with the ANOVA test using two fixed factors as the two variables were independent. The minimum level for statistical confidence of 95% for all analyses.

3. Results

3.1 Tolerance to adverse conditions and survival of simulated gastrointestinal transit

It was observed that the survival rate of *L. casei* P054 evaluated was ≥ 8 log UFC/mL (>70%) when submitted to different acidic conditions (pH 2, pH 2.5, and pH 2.5 with pepsin), bile salt concentrations (0.3% and 0.1%), and 0.4% phenol (Table 1), isolate evaluated did not meaningful reduce its multiplication, as shown in.

Figure 1 shows the cellular concentrations of *L. casei* P054 during passage through simulated gastric and intestinal tracts in the presence and absence of food. It was possible to observed that the isolate was less effective after passage through gastric juices lacking food than with food ($p = 0.001$). After 30 min of exposure to the simulated gastric tract without food, no viable cell counts were observed. On the other hand, the viable cell count remained stable (8 log UFC/mL) when food was added. The results also indicated that passage time influenced bacterial multiplication ($p = 0.001$) (Figure 1C).

In simulations of intestinal tract passage without bile, the presence of the food had no influence on multiplication of *L. casei* P054 ($p = 0.335$) (Figure 1A). In contrast, *L. casei* P054 growth was influenced by the time in the gastric tract ($p = 0.033$). When the intestinal environment was simulated with bile, the presence of food did not influence on multiplication of the isolate ($p=0.926$), however, the time in intestinal tract conditions impacted the multiplication of *L. casei* P054 ($p = 0.002$) (Figure 1B).

3.2 Antagonist activity and susceptibility to clinical antimicrobials

Lactobacillus casei P054 evidenced antagonistic activity, showing inhibition zones against *Salmonella Typhimurium* (18.5mm), *Staphylococcus aureus* (23.5mm), *Listeria monocytogenes* (15.5mm), and *Escherichia coli* (18.0mm). No significant difference was observed between the inhibition halos ($p = 0.124$). Susceptibility profile results are shown in Table 2. *L. casei* P054 was susceptible to 90% (9/10) of the antimicrobials tested (ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, penicillin G, sulfonamide, tetracycline, vancomycin, streptomycin or ampicillin).

3.3 Self-aggregation and co-aggregation abilities

Table 3 shows the percentages of self-aggregation and co-aggregation of *L. casei* evaluated at different temperatures and incubation periods. The adhesion properties of *L. casei* P054 were not altered ($p > 0.05$) at the different temperatures (20°C and 37°C) and times (20 h and 24 h). Nevertheless, it showed the ability to self-aggregation above 75% after 20 h of incubation at different temperatures. Additionally, a significant difference in co-aggregation percentages (>79%) with *Listeria monocytogenes* was evidenced in 24 h of incubation at 37°C.

3.4 Hemolytic activity and cytotoxicity

Lactobacillus casei P054 showed no hemolytic activity, since α or β hemolysis zones were not detected. Furthermore, under the conditions in which the cytotoxicity assay was performed, it was observed that cell viability was above 100%, demonstrating that *L. casei* P054 had no cytotoxic effect on MDBK cells.

4. Discussion

Lactobacillus casei may be a probiotic capable of strengthening and benefit the intestinal tract microbiota, relieving gastrointestinal discomfort, and helping maintain high concentrations of immunoglobulins and defense cells. Additionally, it also can aid in defending against respiratory tract infections (Gleeson et al., 2010; Ayala-Monter et al., 2019). In this research we demonstrate the *in vitro* probiotic potential of *L. casei* from colostrum and bovine colostrum silage, the presence of food.

The isolate evaluated showed around >70% survival in adverse conditions, including gastric and intestinal simulations. Similar results were obtained by Vitola et al. (2019), Bhagya et al. (2018) and Meira et al. (2010) when evaluating *Lactobacillus* spp., human colostrum and sheep milk, respectively.

Charteris et al. (1997) propose that microorganisms capable of surviving gastric simulations as evidenced by resistance to acidic conditions will, at most, reduce their cell concentrations to 70% pre-exposure levels. In contrast, cells are considered capable of surviving of intestinal transit as evidenced by resistance to bile salts if they show a cell count reduction of less than 1.5 Log of their initial count. These characteristics were observed in the present study for *L. casei* P054.

Passage through gastrointestinal tract simulations is meant to expose cells to conditions encountered during transit to the site of action (Sidira et al., 2013). For the isolate evaluated in this study, passage through the simulated gastric tract without food present decreased cellular proliferation. Food present during the passage of cells through the gastric tract provides protection for bacteria by acting as a buffer for environmental conditions, helping maintain cellular viability (Vitola et al., 2018). However, according to Huang and Adams (2004), the low tolerance of BAL to simulate gastric juice is not sufficient to exclude the use of the microorganism as a probiotic.

Ranadheera et al. (2010) established that the presence of food influences growth, viability, acid and bile tolerance, and the functionality of probiotic organisms, determining their survival in the gastrointestinal tract. Similarly, Pinto et al. (2006) stated that the presence of food is important and should be adopted in the *in vitro* evaluation of potential probiotics, since it constitutes a notable variable that can affect bacterial survival during passage through the stomach. Additionally, Meira et al. (2010) observed protective effects of milk and correlated the addition of milk with an increase pH of the digestive tract. In the present study, during gastrointestinal tract simulation tests, both with and without bile and/or food, cells remained viable in an appropriate range of concentrations. However, incubation times influenced the multiplication of *L. casei*. On the other hand, *L. casei* P054 maintained viability above 8 log UFC/mL, showing that is able to persist during exposure host gastrointestinal tract conditions. Similar results have been reported by Sidira et al. (2013), Dimitrellou et al. (2016) and Tiptiri-Kourpeti et al. (2016). According to Charteris et al. (1998) and Sidira et al. (2013), in order for a probiotic bacterium to colonize the intestine and provide beneficial effects, it should reach the intestine at a population level of at least 6 log UFC/mL.

According to Guedes Neto et al. (2005), the inhibition of pathogenic microorganisms helps improve BAL survival in environments with diverse and complex microbiota. In addition, some pathogens are commonly transmitted by food (CDC, 2018).

In addition, Pato et al. (2017) detected resistance of *L. casei* R68 and an *L. casei* commercial strain to five antimicrobials, including erythromycin, amoxicillin, tetracycline and ciprofloxacin. Sulfonamide resistance may be related to the indiscriminate use of antimicrobials in animal farms (Sarmah et al., 2006), including to prevent or treat infections in cattle, and the use as preservatives for commercial vaccines (Mathur and Singu, 2005).

The ability to self-aggregate (>75%) of *L. casei* P054 was satisfactory according to the literature, suggesting that this microorganism has potential to adhere to the intestinal epithelium of the host organism. Similar results were reported by Vitola et al. (2018). However, Gómez et al. (2016) detected 67% self-aggregation by different BAL evaluated in their study.

Co-aggregation is an important feature in probiotic microorganisms, because it helps to form a barrier against colonization by intestinal pathogens (Reid et al., 1988). *Lactobacillus casei* P054 evidenced significant co-aggregation percentage (>79%) with *L. Monocytogenes* in 24 h of incubation at 37°C. Previously, Vitola et al (2018) evaluated the *in vitro* co-aggregation between *E. coli* and three isolates of *L. casei* from bovine colostrum silage. The authors reported percentages of 47.37%, 57.10% and 60.85% after 20 h of incubation at 37°C. In a study performed by García-Cayuela et al. (2014) evaluating the co-aggregation abilities between *L. plantarum* and *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *E. coli*, the authors detected a co-aggregation percentage of less than 40% after 24 h of incubation. Though, according Vitola et al (2018) the auto-aggregation and co-aggregation abilities are dependent on the BAL evaluated and pathogens tested, as well as on temperatures and time of incubation at which the *in vitro* test is performed (GARCÍA-CAVUELA et al., 2014).

The cyA absence of cytotoxicity and hemolytic activity of the evaluated microorganism demonstrate its safety, for future application as a probiotic BAL. This research corroborates the previous study of Vitola et al. (2018) and highlights the properties of colostrum and bovine colostrum silage as food additives, which promoting nutrition, immunity, and health and can be safely used in food and feed.

5. Conclusion

The results of the present study indicate that *L. casei* P054 bovine colostrum silage has relevant probiotic potential *in vitro*. However, *in vivo* studies are being developed to verify the potential of the immune response.

Acknowledgments

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - Finance Code 001).

Conflict of Interest

None of the authors of this manuscript has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence the content of this work.

References

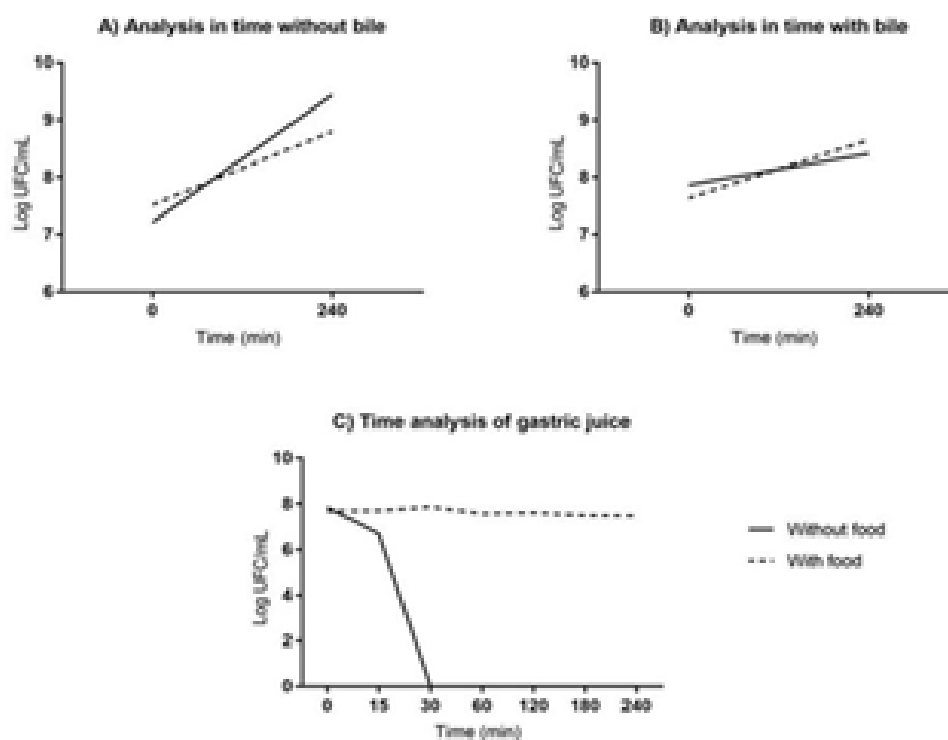
- Adams, M.R. and Marteau, P. (1995) On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* 27, 263-264.
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, and Bhalla, T. C. (2016) Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Sci Technol* 66, 428-435.
- Ayala-Monter, M.A., Hernández-Sánchez, D., González-Muñoz, S., Pinto-Ruiz, R., Marinez-Aispuro, J.A., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J. and Gloria-Trujillo, A. (2019) Growth performance and health of nursing lambs supplemented with inulin and *Lactobacillus casei*. *Asian-Australas J Anim Sci* 32, 1137-1144.
- Begley, M., Hill, C. and Gahan, C.G.M. (2006) Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72, 1729–1738.
- Bhagya, H.M., Renuka, B., Naika, M., Batra, H.V. and Murali, H.S. (2018) Screening for Folate Producing Lactic Acid Bacteria from Colostrum and Characterization of their Probiotic Potential. *J Pure Appl Microbio* 12, 765-776.
- Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L. and Gershwin, M.E. (2009) Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 44, 26–46.
- Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2018). List of Selected Multistate Food borne outbreak investigations. <https://www.Cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>. Accessed 14/04/19.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. And Collins, J.K. (1997) Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J Food Microbiol* 35, 1-27.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.clsi.org>. Accessed 14/04/19.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S. (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* 226, 1065–1073.

- Curragh, H.J. and Collins, M.A. (1992) High levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *J Appl Microbiol* 73, 31-36.
- Dimitrellou, D., Kandyli, P. and Kourkoutas, Y. (2016) Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. *LWT – Food Sci Technol* 69, 468–473.
- García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I.P., Gómez de Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C. and Martínez-Cuesta, M.C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res Int* 57, 44-50.
- Gleeson, M., Bishop, N.C., Oliveira, M. and Tauler, P. (2010) Daily Probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) Reduction of Infection Incidence in Athletes. *Int J Sport Nutr Exe* 21, 55-64.
- Godhia, M.L. and Patel, N. (2013) Colostrum - Its Composition, Benefits As A Nutraceutical: A Review. *Curr Res Nutr Food Sci* 1, 37-47.
- Gómez, N.C., Ramiro, J.M., Quecan, B.X. and de Melo Franco, B.D. (2016). Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157 : H7 Biofilms Formation. *Front Microbiol* 10, 857:863.
- Grivennikov, S.I., Sergei, I., Greten, F.R. and Karin M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Guedes Neto, L.G., Souza, M.R., Nunes, A.C., Nicoli, J.R. and Santos W.L.M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microorganismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57, 245-250.
- Halder, D. Manisha, M. Shiv, C.S. Nishith, P.K. & Shyamapada, M. (2017). Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicine*, 5,31.
- Herick, R. and Levkut, M. (2002) Lactic acid bacteria, probiotic and immune system. *Vet Med - Czech* 47, 169-180.
- Huang, Y. and Adams, M.C. (2004) In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int J Food Microbiol* 91, 253–260.
- Iyer, R. and Tomar, S.K. (2009) Folate: A Functional Food Constituent. *J Food Sci* 74, 114-122.

- 391 Magalhães, K.T., Pereira, G.V.M., Campos, C.R., Dragone, G. and Schwan, R.F.
 392 (2011) Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition.
 393 *Braz J Microbiol* 42, 693-702.
- 394 Marnila, P. and Korhonen, H. (2002) Colostrum. In Encyclopedia of Dairy Sciences.
 395 ed. Roginski, H., Fuquay, J.W. and Fox, P.F. pp. 473-478. London: Academic Press.
- 396 Mathur, S. and Singh, R. (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A
 397 review. *Int J Food Microbiol* 105, 281–295.
- 398 Meira, S.M.M., Helfer, V.E., Velho, R.V. and Medina, L.F.C. (2010) Identificação e
 399 resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de
 400 ovelha. *Braz J Food Technol* 12, 75-80.
- 401 Monnappa, A. K., Bari, W., Choi, S. Y., and Mitchell, R. J. (2016). Investigating the
 402 responses of human epithelial cells to predatory bacteria. *Scientific reports*, 6, 33485.
- 403 Morelli, L. and Wright, A.V. (1997) Probiotic bacteria and transferable antibiotic
 404 resistance-safety aspects. Demonstration of the Nutritional Functionality of Probiotic.
 405 *Foods News Letter* 2, 9-14.
- 406 Organização Mundial da Saúde - OMS (2019). <https://www.who.int>. Accessed
 407 16/02/19.
- 408 Ouoba, L.I.I., Lei, V. and Jensen, L.B. (2008) Resistance of potential probiotic lactic
 409 acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials:
 410 Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int J Food*
 411 *Microbiol* 121, 217-224.
- 412 Pakkanen, R. and Aalto J. (1997) Growth factors and antimicrobial factors in bovine
 413 colostrum. *Int Dairy J* 7, 285–297.
- 414 Patel, N., Oudemans, P. V., Hillman, B. I., and Kobayashi, D. Y. (2013). Use of the
 415 tetrazolium salt MTT to measure cell viability effects of the bacterial antagonist
 416 *Lysobacter enzymogenes* on the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*. *Antonie*
 417 *Van Leeuwenhoek*, 103 (6), 1271-1280.
- 418 Pato, U., Setiari, D.J.V., Khairunnisa, F. and Hasibuan, R.D.H. (2017) Antibiotic
 419 resistance and antibacterial activity of dadih originated *Lactobacillus casei* subsp.
 420 *Casei* r-68 against food borne pathogens. *Asian Jr Microbiol Biotech Env Sc's* 19, 577-
 421 587.
- 422 Perelmuter, K., Fraga, M. and Zunino, P. (2008) In vitro activity of potential probiotic
 423 *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *J Appl Microbiol* 104, 1718- 1725.
- 424

- 425 Pestana, M.H. and Gageiro, J.N. (2008) *Análise de Dados para Ciências Sociais: a*
 426 *Complementaridade do SPSS 5ed.* Lisboa: Edições Sílabo, Lda.
- 427 Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (2006).
 428 *Lactobacillus* spp . with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional
 429 fermented products. *Int J Food Microbiol* 109, 205–214.
- 430 Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M. and Gil, A. (2018) Immune-Mediated
 431 Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal
 432 Diseases. *Nutrients* 10, 42.
- 433 Plumb, J.A. (2004) Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture.*
 434 *Humana Press*, 165-169.
- 435 Reid, G., McGroarty, J. A, Angotti, R. and Cook, R. L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor
 436 production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can*
 437 *J Microbiol* 34, 344–351.
- 438 Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J.,
 439 and Minor, L. (2016). Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli
 440 Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- 441 Rossi, M., Amaretti, A. and Raimondi, S. (2011) Folate Production by Probiotic
 442 Bacteria. *Nutrients* 3, 118-134.
- 443 Saalfeld, M. H. (2013) *Silagem de colostro bovino: propriedades e potencialidades de*
 444 *usos.* 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas,
 445 Pelotas.
- 446 Saalfeld, M.H., Pereira, D.I.B., Silveira, K.R.K., Schramm, R., Valente, J.S.S.,
 447 Borchardt, J.L., Gularte, M.A. and Leite, F.P.L. (2013) Anaerobically fermented
 448 colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciênc Rural.* 43, 1636-1641.
- 449 Saalfeld, M.H., Pereira, D.I.B., Borchardt, J.L., Sturbelle, R.T., Rosa, M.C., Guedes,
 450 M.C., Gularte, M.A. and Leite, F.P.L. (2014) Evaluation of the transfer of
 451 immunoglobulin from colostrum anaerobic fermentation (colostrum silage) to newborn
 452 calves. *Anim Sci J* 85, 963-967.
- 453 Saalfeld, M.H., Pereira, D.I.B., Valente, J.S.S., Borchardt, J.L., Weissheimer, C.F.,
 454 Gularte, M.A. and Leite, F.P.L. (2016) Effect of anaerobic bovine colostrum
 455 fermentation on bacteria growth inhibition. *Cienc Rural* 46, 2152-2157.
- 456 Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000)
 457 Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84,
 458 197-215.

- 459 Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Vos de, W.M.,
 460 Fonde'n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Sandholm,
 461 T.M. (1998) Demonstration of safety of probiotics—a review. *Int. J. Food Microbiol* 44,
 462 93-106.
- 463 Sarmah, A.K., Meyer, M.T. and Boxall, A.B.A. (2006) A global perspective on the use,
 464 sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (vas)
 465 in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.
- 466 Sidira, M., Saxami, G., Dimitrellou, D., Santarmaki, V., Galanis, A. and Kourkoutas, Y.
 467 (2013). Monitoring survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in probiotic yogurts using
 468 an efficient molecular tool. *J Dairy Sci* 96, 3369–3377.
- 469 Thomas, C.M. and Versalovic, J. (2010) Probiotics-host communication: Modulation of
 470 signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 1, 148-163.
- 471 Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E.,
 472 Lamprianidou, E.E., Saxami, G., Ypsilantis, P., Lampri, E.S., Simopoulos, C.,
 473 Kotsianidis, I., Galanis, A., Kourkoutas, Y., Dimitrellou, D. and Chlichlia, K. (2016)
 474 *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell
 475 death and upregulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *Plos One* 11, 1–20.
- 476 Tripathi, V. And Vashishtha, B. (2006) Bioactive compounds of colostrum and its
 477 application. *Food Revs Int* 22, 225-244.
- 478 Van Hooijdonk, A.C.M., Kussendrager, K.D. and Steijns, J.M. (2000) In vivo
 479 antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved
 480 in non-specific defence. *Br J Nutr* 84, 127-134.
- 481 Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT
 482 assay. *Cancer cell culture*, 237-245.
- 483 Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria:
 484 a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier
 485 resistance. *Food Res Int* 36, 895-904.
- 486 Vitola, H.R.S., Dannenberg, G.S., Marques, J.L., Lopes, G.V., Silva, W.P., Fiorentini,
 487 A.M. (2018) Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine
 488 colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochem*
 489 75, 22–30.
- 490 Zanirati, D.F., Abatemarco, M.J., Sandes, H.C., Nicoli J.R., Nunes, A.C. and Neumann,
 491 E. (2015) Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use
 492 as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 32, 70-76.



493

L

494

Figura 3 - Análise da alimentação

495

Fonte: realizado pelos autores.

pH	Survival to acid conditions			Survival to bile salts (BS) / phenol			
	Time (hours)	Log UFC/mL	Reduction (Log)	BS/ Phenol	Time (hours)	Log CFU/mL	Reduction (Log)
2	0	8.07	0.11	BS 0.1 %	0	8.65	0.42
		8.11				8.53	
	4	7.9			4	8.17	
		8.06				8.17	
2.5	0	8.19	0.03	BS 0.3 %	0	8.51	0.23
		8.02				8.56	
	4	8.02			4	8.75	
		8.13				8.78	
2.5 C/ Pepsin	0	8.16	0.47	Phenol 0.4%	0	8.67	0.05
		8.06				8.52	
	4	8.61			4	8.68	
		8.56				8.60	

496

497

498

499

Figura 4 - Resistência do *Lactobacillus casei* P054 a condições adversas (tolerância à acidez, sais biliares e fenol)

Fonte: realizado pelos autores.

<i>L. casei</i> P054			
Antimicrobial	Susceptibility	Halo (mm) Duplicate average	Standard CLSI, 2018 (mm)
Erythromycin 15 µg	Susceptible	31,5	≤ 13 ≥ 23
Streptomycin 10 µg	Susceptible	19	≤ 11 ≥ 15
Penicillin 10 UOF	Susceptible	23	≤ 19 ≥ 20
Vancomycin 30 µg	Susceptible	22,5	≤ 16 ≥ 17
Gentamicin 10 µg	Susceptible	20,5	≤ 12 ≥ 15
Chloramphenicol 300 µg	Susceptible	32	≤ 12 ≥ 18
Ampicillin 10 µg	Susceptible	31	≤ 13 ≥ 17
Tetracycline 30 µg	Susceptible	33	≤ 11 ≥ 15
Ciprofloxacin 5 µg	Susceptible	33	≤ 15 ≥ 21
Sulfonamide 250 µg	Resistant	5	≤ 17 ≥ 17

Figura 5 - Perfil de suscetibilidade de *Lactobacillus casei* P054
 Fonte: realizado pelos autores.

Time (hours)	Temperature °C	
	20	37
Self aggregation of <i>L. casei</i> P054 (%)		
2	18.88 ^a	22.24 ^a
20	81.12 ^c	77.19 ^c
24	82.24 ^c	80.18 ^c
Co-aggregation of <i>L. casei</i> P054 with <i>Listeria monocytogenes</i> (%)		
2	21.60 ^a	24.30 ^a
4	58.93 ^b	62.63 ^b
24	55.25 ^b	79.12 ^c

Figura 6 - Porcentagens de autoagregação e coagregação de *Lactobacillus casei* P054 em diferentes temperaturas e períodos de incubação
 Fonte: realizado pelos autores.

“Declaration of interest”

- The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

507
508
509

Figura 7 - Declaração de interesse
Fonte: realizado pelos autores.

5.2 Manuscrito 2

Efeito imunomodulador da suplementação de *Lactocaseibacillus casei* P054 em bovinos vacinados contra Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

Carolina Litchina Brasil; Vitoria Sequeira Gonçalves; Francisco Denis Souza Santos; Julia Silveira Valente; Fábio Pereira Leivas Leite; Daniela Isabel Brayer Pereira

Será submetido a revista Scientific Reports, Qualis CB III – A1

Efeito imunomodulador da suplementação de *Lactiseibacillus casei* P054 em bovinos vacinados contra Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

Immunomodulatory effect of *Lactiseibacillus casei* P054 supplementation in cattle vaccinated against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)

Carolina Litchina Brasil; Vitoria Sequeira Gonçalves; Francisco Denis Souza Santos; Julia Silveira Valente; Fábio Pereira Leivas Leite; Daniela Isabel Brayer Pereira

Resumo

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando suplementados em quantidades adequadas. São capazes de promover a imunomodulação estimulando a atividade dos fagócitos, a proliferação de leucócitos, a produção de anticorpos e a expressão de citocinas. Bactérias ácido lácticas apresentam propriedades probióticas que melhoram a nutrição, produtividade e imunidade dos ruminantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com *Lactiseibacillus casei* P054 em bovinos vacinados contra a IBR. Previamente, esplenócitos de bovinos foram cultivados e submetidos a estimulação com 10µg de *L. casei* P054 (10^6 UFC), ou com 5µg de Concanavalina A como controle positivo. Posteriormente, bovinos (n=10) receberam por via oral uma suspensão de 4×10^9 UFC de *L. casei*. Bovinos do grupo controle (n=10) receberam 20 mL de solução PBS. Os animais foram tratados diariamente durante 35 dias com a suplementação de *L. casei* e administração de PBS. Cinco dias após o início dos tratamentos, os bovinos foram vacinados com vacina comercial contra IBR, sendo revacinados 21 dias após a primeira dose. A estimulação *in vitro* de esplenócitos bovinos com *L. casei* P054 evidenciou significativo aumento dos níveis de transcrição do mRNA de IL2, IL4, IL10 e IL17 quando comparado ao controle estimulado com Concanavalina. Notou-se que a partir de sete dias após a primeira dose de vacina até o final do experimento, o grupo de animais que recebeu suplementação, evidenciou níveis superiores de IgG anti-BoHV-1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, os níveis de transcrição de mRNA para IL2, IL4, IL10 e IL17 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos animais suplementados foram superiores aos animais controle ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo

permitem surgir que a suplementação com *L. casei* P054 exerce excelente efeito modulador na resposta imune de bovinos vacinados.

Palavras-chave: probióticos; efeito adjuvante; imunomodulação; citocina

Abstract

Probiotics are living microorganisms that provide health benefits to the host when supplemented in adequate amounts. They are capable of promoting immunomodulation by stimulating phagocyte activity, leukocyte proliferation, antibody production and cytokine expression. Lactic acid bacteria have probiotic properties that improve the nutrition, productivity and immunity of ruminants. The aim of the present study was to evaluate the immunomodulatory effect of supplementation with *Lactocaseibacillus casei* P054 in cattle vaccinated against IBR. Previously, bovine splenocytes were cultured and subjected to stimulation with 10 µg of *L. casei* P054 (10⁶ CFU), or with 5 µg of Concanavalin A as a positive control. Subsequently, cattle (n = 10) received a 4 × 10⁹ CFU suspension of *L. casei* orally. Cattle of the control group (n = 10) received 20 mL of PBS solution. The animals were treated daily for 35 days. Five days after the beginning of the treatments, the cattle were vaccinated with a commercial vaccine against IBR, being revaccinated 21 days after the first dose. In vitro stimulation of bovine splenocytes with *L. casei* P054 showed a significant increase in the levels of mRNA transcription of IL2, IL4, IL10 and IL17 when compared to the control stimulated with Concanavalin. It was noted that from seven days after the first dose of vaccine until the end of the experiment, the group of animals that received supplementation, showed higher levels of anti-BoHV-1 IgG (p <0.05). In addition, the levels of mRNA transcription for IL2, IL4, IL10 and IL17 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from supplemented animals were higher than control animals (p <0.05). The results of the present study allow us to infer that supplementation with *L. casei* P054 has an excellent modulating effect on the immune response of vaccinated cattle.

Keywords: probiotics; adjuvant effect; immunomodulation; cytokine.

1 Introdução

Os probióticos englobam um grupo de microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades adequadas (FAO/ OMS, 2002; HILL et al., 2014). São capazes de estimular a imunomodulação,

favorecendo a proliferação de leucócitos, produção de anticorpos, aumento da atividade fagocitária e alterações na expressão de citocinas (FORSYTHE & BIENENSTOCK, 2010; HABIL et al., 2011; SHIDA et al., 2011).

Bactérias ácido lácticas (BAL) apresentam potencial probiótico e são comumente encontradas em produtos fermentados (iogurtes, queijos, etc.) (KARAKAS-SEM & KARAKAS, 2018). As mais conhecidas espécies de BAL com potencial probiótico foram isoladas de leite e seus derivados, como *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. johnsonii*, entre outros (BAO et al., 2010; PLESSAS et al., 2017; KARAKAS-SEN & KARAKAS, 2018). Saalfeld et al. (2013) isolaram e caracterizaram *Lactobacillus casei* P054 de colostro e silagem de colostro bovino e demonstraram que este alimento promoveu o aumento de peso corporal ao ser administrado para bovinos lactentes.

Abd El-Tawab et al. (2016) explicam que o uso de probióticos na nutrição de ruminantes pode melhorar a saúde, produtividade e a imunidade dos animais. Adicionalmente, Santos et al. (2020) evidenciaram modulação da resposta imune vacinal em ruminantes (ovinos) ao utilizarem uma suplementação contendo o probiótico *Bacillus toyonensis*. Recentemente, Mani et al. (2021) verificaram alterações benéficas da microbiota ruminal ao suplementar a alimentação de ovinos com BAL.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito imunomodulador da suplementação com *Lactobacillus casei* P054 em bovinos vacinados contra rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR).

2 Material e Métodos

2.1 Preparação do inóculo de probiótico *Lactobacillus casei* P054

Lactobacillus casei P054 foi identificado por suas características morfológicas, bioquímicas e sequenciamento de DNA. Previamente as propriedades probióticas deste isolado foram avaliadas *in vitro* (dados não mostrados).

Lactobacillus casei P054 foi semeado em MRS agar (de Man Rogosa & Sharpe), sem denominação de marca, e incubado a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento de colônias isoladas, foram inoculadas 3-5 colônias em frascos tipo Erlenmeyer, contendo 100 mL de meio MRS broth, e incubados em agitador orbital a 100 rpm, a 37°C por 24 horas. Posteriormente uma alíquota de 10 mL desses cultivos

foi transferida para frascos contendo 500 mL de MRS broth, sendo incubados em agitador orbital a 100 rpm, a 37°C, durante 24 horas, sem correções de pH durante o cultivo.

A concentração de *L. casei* P054 obtida nesses cultivos foi de aproximadamente 4×10^9 UFC/mL. O controle de pureza foi realizado em todas as etapas do processo por semeadura em esgotamento em BHI agar (Brain Heart Infusion), MRS e Sabouraud agar e coloração de Gram, sem denominação de marca.

2.2 Expressão de mRNA das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 em esplenócitos bovino

Os esplenócitos foram obtidos a partir da coleta do baço de bovinos abatidos em um frigorífico do município de Pelotas/ RS (-52.4487 31° 46' 3" Sul, 52° 26' 55"). Os órgãos foram acondicionados em caixas isotérmicas e transportados ao laboratório. Imediatamente, os esplenócitos foram cultivados em placas de 24 poços (Kasvi – modelo K12-024), segundo protocolo de Dummer et al. (2014) com modificações. O experimento foi realizado independentemente duas vezes utilizando-se 3 poços por estímulo.

As células foram estimuladas por 20 horas em meio RPMI com 10µg de *L. casei* P054 na concentração de 10^6 UFC, ou com 5µg de Concanavalina A (ConcA) (Sigma-Aldrich) como controle positivo e somente meio RPMI como controle negativo. Após o sobrenadante foi coletado e armazenado, as células foram coletadas em Trizol® (*Life Technologies*, Carlsbad, CA USA) e posteriormente o mRNA celular extraído segundo protocolo do fabricante e armazenados a -80°C. O mRNA foi utilizado como molde para síntese de cDNA utilizando *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*).

2.3 Transcrição de citocinas

A análise de transcrição e expressão de mRNA das citocinas (*IL-2*, *IL-4*, *IL-10*, *IL-17*) em esplenócitos foram quantificadas por meio de qPCR (Mx30005P QPCR System - Agilent Technologies). A reação foi realizada com temperatura de desnaturação a 95°C, anelamento a 60°C e extensão a 72°C. Os oligo iniciadores (*primers*) empregados nas reações estão descritos na tabela 1. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e repetidas duas vezes.

Tabela 1: Sequência e temperatura de *melting point* dos oligo iniciadores utilizados na qPCR.

PRIMER	Tm°	Sequência (5'-3')
β actina Forward	66.4	TGTCCACCTTCCAGCAAGTG
β actina Reverse	65.1	CTAGAAGCATTTGCGGTGGA
IL-2 Forward	68.1	CCTCGAGTCCTGCCACAATG
IL-2 Reverse	64.0	CCGTAGAGCTTGAAGTAGGTGC
IL-4 Forward	67.2	GCCACACGTGCTTGAACAAA
IL-4 Reverse	66.5	TCTTGCTTGCCAAGCTGTTG
IL-10 Forward	65.1	GTCTGACAGCAGCTGTATCCACTTG
IL-10 Reverse	67.5	AACCCTGGATTGGATTTCAGAGGTC
IL-17A Forward	67.1	CACAGCATGTGAGGGTCAAAC
IL-17A Reverse	65.0	GTGGAGCGCTTGTGATAAT

Tabela 1 - Os valores de Ct obtidos pelo qPCR foram analisados pela seguinte fórmula (Livak & Schmittgen, 2001): $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

$$\Delta\Delta Ct = \frac{(Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping}) - (Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping})}{\text{Estímulo}} - \frac{(Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping})}{\text{Meio}}$$

Estímulo Meio

2.4 Suplementação dos bovinos com *L. casei* P054, vacinação e avaliação da resposta imunomoduladora

O experimento foi realizado em uma propriedade rural do município de Bagé/RS (31.3301°S, 54.1005°W). Vinte bovinos da raça Hereford, jovens, com 5 meses de idade foram gentilmente cedidos pelo proprietário dos animais para o desenvolvimento deste estudo. Os animais eram mantidos em pastagem natural (campo nativo) sem restrição de alimentação ou água e diariamente era fornecido 1,5 kg de ração comercial Gadobel desmame (Agrobella nutrição animal®), sem indicação do peso médio dos animais. Os bovinos apresentavam-se sadios e livres de ecto e endoparasitas e foram diariamente acompanhados por médico veterinário durante todo o período experimental.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 10 animais, denominados: grupo probiótico e grupo controle. O grupo probiótico recebeu por via oral, com pistola dosadora, uma suspensão de 20 mL contendo 4×10^9 UFC de *L. casei* preparada conforme descrito anteriormente. Os animais do grupo controle receberam via oral com pistola dosadora, 20 mL de solução tamponada de fósforo (PBS). Tanto a suplementação com *L. casei*, como a administração de PBS foi diária durante 35 dias. Cinco dias após o início dos tratamentos, os bovinos foram vacinados pela via subcutânea com 5mL de uma vacina comercial (Cattle Master, Zoetis®), vacina contra

Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarréia Viral Bovina (BVD), Parainfluenza, Tipo 3 (PI3), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), e *Leptospira Canicola-Grippotyphosa-Hardjolcterohaemorrhagiae-Pomona*. O reforço vacinal foi realizado 21 dias após a primeira dose. Amostras de sangue foram colhidas a partir da punção da veia jugular e coccígea com *vacutainer* calibre 25 mm x 0,8 (BD®) acoplado diretamente em tubos estéreis para sangue de 2 mL sem anticoagulante nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35. O soro foi separado, identificado e armazenado a -20°C até o momento da realização das análises.

Todos os animais foram pesados ao início do experimento D0, no 21º dia, após o início da administração do probiótico e ao final do experimento D35. Os dados foram planilhados e posteriormente submetidos a análise estatística.

2.4.1 Dinâmica da resposta de IgG total anti BOHV-1

Para a avaliação da dinâmica de IgG anti herpes vírus bovino – 1 (BoHV-1) foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, visto que a avaliação do BoHV-1 foi realizada os testes sorológicos pareados com a ELISA devido sua praticidade e menor tempo, sendo que pode ser realizado por soroneutralização ou ELISA. A BoHV-1 apresenta a funcionalidade como agente viral genético, utilizado em bovinos. Um agente comospolita de alta ocorrência em rebanhos de todo o mundo. Placas de microtitulação de 96 cavidades (COSTAR, Corning, NY) foram sensibilizadas com BoHV-1 inativado na concentração de $10^{5\text{TCID}_{50}}$ por cavidade, pelo período de 18h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL de solução salina fosfatadas contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), por cavidade. As amostras de soro foram diluídas 1:1000 e 100 µL de cada foi adicionado nas placas em triplicata, a escolha pela técnica de diluição semeadura em placas permite realizar a semeadura em toda a superfície da placa. As placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Após a incubação, foram lavadas com PBS-T, seguidas de adição de 100 µL de anticorpo conjugado anti-IgG bovino diluído 1:2500 e incubação de 60 minutos a 37°C. Após esse período as placas foram lavadas com PBS-T e foram adicionados 100µL de solução de revelação contendo 10 mL de tampão substrato, 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15µL de H₂O₂ por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Para interromper a reação, sem indicação de tempo de interropição, foram adicionados 50µL por poço de H₂SO₂ 2N. As absorbâncias foram

registradas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, Cambridge, UK) com filtro de 492 nm.

2.4.2 Cultura de células mononucleares do sangue periférico bovino (PBMCs) e extração de mRNA das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17

No 35º dia do experimento, amostras de sangue (10 mL) dos animais de ambos os grupos foram coletadas através da punção da veia jugular em tubos *vacutainer* contendo citrato de sódio (0.38%, v/v) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) como anticoagulante. A obtenção das PBMCs foi realizada conforme descrito por Leite et al. (2004).

Aproximadamente 2×10^9 células foram cultivadas em 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich), antibiótico e antifúngico (Penicilina 10.000 UI/mL, Estreptomicina 10 mg/mL e Anfotericina B 25 mg/mL) (Gibco) em placas de cultivo celular com 24 poços (Kasvi, Taiwan, China). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído e as células foram estimuladas com 10µg de *L. casei* P054, ou com 10µg de ConcA (controle positivo) e com meio RPMI 1640 (controle negativo). Após, incubadas por 18 horas nas mesmas condições.

Ao final, o sobrenadante foi descartado e as células foram coletadas em reagente TRIzol® e o mRNA celular foi extraído segundo protocolo do fabricante e armazenados a -70°C. A metodologia empregada seguiu as mesmas condições de reações descritas anteriormente em esplenócitos bovino.

2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados em Software GraphPad Prism version 7 (San Diego, CA, USA). Os valores das médias dos níveis de IgG dos soros dos animais de cada grupo, obtidos pelo ELISA indireto, foram submetidos à análise de variância (two way ANOVA). As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey considerando-se diferença significativa quando $p < 0.05$. As diferenças entre os níveis de transcrição de mRNA foram analisadas por one way ANOVA seguido pelo teste t de Student. A média do ganho de peso diário dos animais do grupo probiótico e controle foi determinada por one way ANOVA seguido pelo teste t de Student.

2.6 Parâmetros éticos

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEAA nº 8224/2017).

3 Resultados

3.1 Dinâmica de IgG total anti-BoHV-1 nos animais vacinados (resposta imune humoral)

Observou-se que ambos os grupos de animais, suplementados com *L. casei* P054 e controle, evidenciaram a produção de anticorpos específicos contra o antígeno viral vacinal. Notou-se que a partir de sete dias após a primeira dose de vacina, o grupo que recebeu suplementação com *L. casei* P054, evidenciou níveis significativos de IgG total ($p < 0.05$), sendo esses níveis superiores em 1,3 vezes ao grupo controle. No 21º dia os níveis de IgG do grupo tratado com probiótico mantiveram-se maiores, com um valor de 2,2 vezes superior aos animais controle ($p < 0.05$). Após a segunda dose vacinal, os níveis de IgG dos animais suplementados mantiveram-se estatisticamente superiores ($p < 0.05$). (Figura 1).

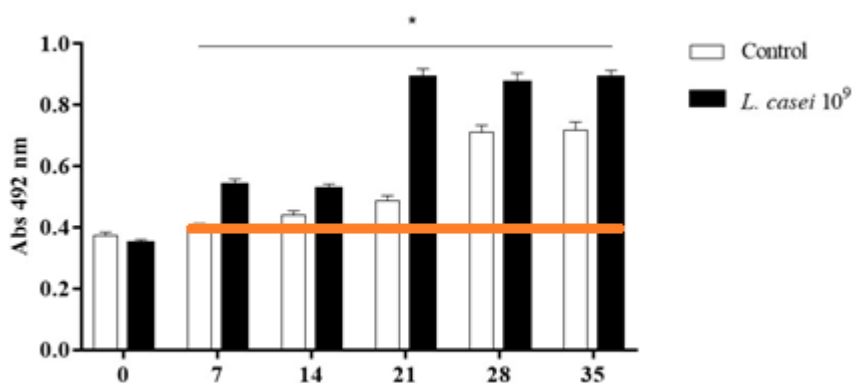


Figura 8 - Dinâmica de IgG contra BoHV-1 em bovinos vacinados com Cattle Master® e suplementados com *L. casei* P054. Os dados representam as médias e desvio padrão da média dos valores de absorbâncias obtidos por ELISA indireto do grupo suplementado e controle durante o período experimental. (*) indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre o grupo suplementado com *L. casei* P054 e o grupo controle.

Fonte: realizado pelos autores.

3.2 Expressão da transcrição gênica em esplenócitos bovinos das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17

Em esplenócitos estimulados com *L. casei* P054 evidenciou-se transcrições ($p < 0.05$) das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17. Quando a estimulação das células com *L. casei* P054 foi comparada ao grupo controle (ConcA), verificou-se que este microrganismo foi capaz de incrementar a transcrição relativa de IL-2, IL-4 e IL-10 em ~30 vezes, ~3.5 vezes e ~2 vezes superior, respectivamente. Interessantemente, a transcrição relativa de IL-17 foi ~200 vezes superior ao do grupo controle (Figura 2).

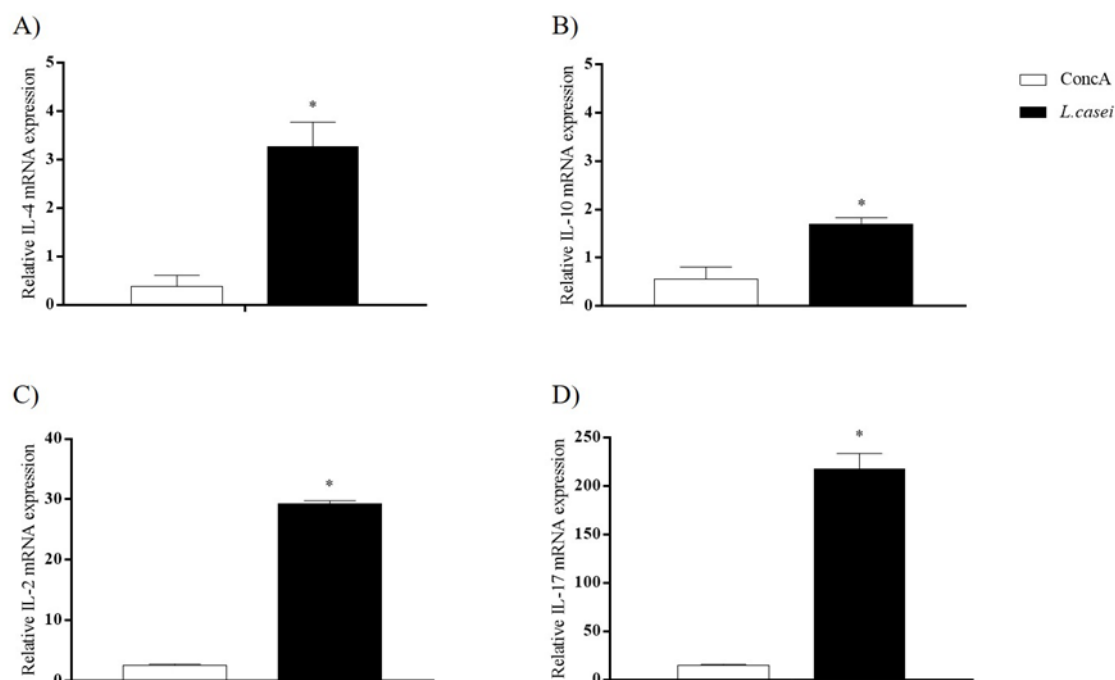


Figura 9 - Transcrição relativa de mRNA das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 a partir do cultivo de esplenócitos bovinos in vitro. Os valores apresentados representam média e desvio padrão da média de $2^{\Delta\Delta Ct}$ obtidos pela técnica de qPCR. A) Transcrição relativa de mRNA de IL-4; B) Transcrição relativa de mRNA de IL-10; C) Transcrição relativa de mRNA de IL-2 e D) Transcrição relativa de mRNA de IL-17. (*) indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre as células estimuladas com *L. casei* P054 e as células estimuladas com ConcA.

Fonte: realizado pelos autores.

3.3 Expressão da transcrição gênica em PBMCs das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17

A análise da transcrição relativa dos genes das citocinas em cultivo de células PBMCs que foram estimuladas com *L. casei* P054 revelou aumento significativo na transcrição das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 nas células oriundas dos animais que receberam a suplementação com *L. casei* P054, comparados às células dos animais controle ($p < 0.05$). Usando os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$, foi possível constatar um aumento de aproximadamente 2,8 vezes na transcrição de IL-2, 1,6 vezes de IL-4, 2,7 vezes de IL-10, e 3,8 vezes de IL-17 (Figura 3). Adicionalmente, evidenciou-se que a expressão

gênica com ConcA foi inferior a expressão com *L. casei* para todas as citocinas avaliadas ($p < 0,05$).

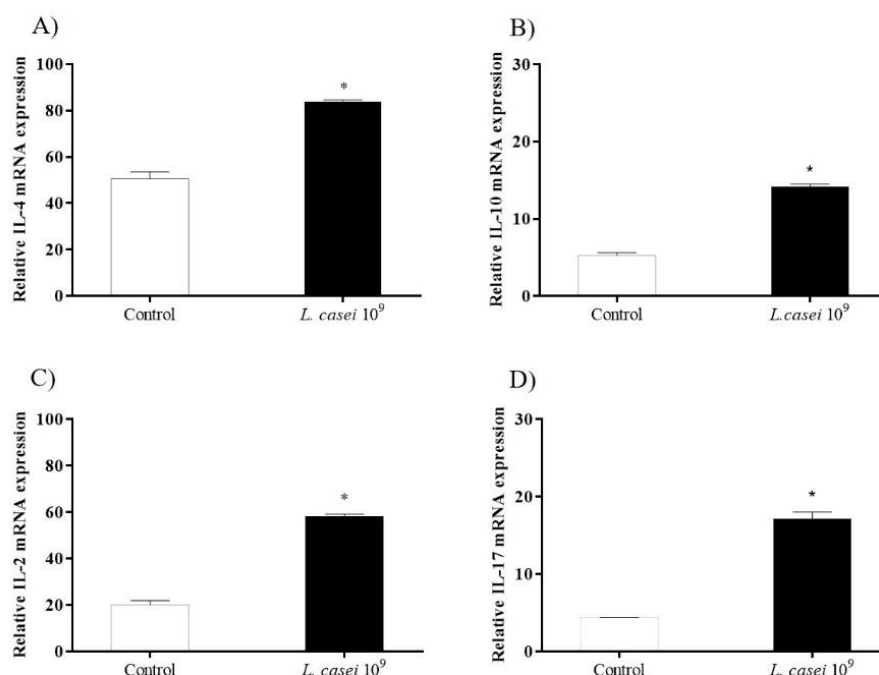


Figura 10 -Transcrição relativa de mRNA das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 a partir do cultivo de PBMC's de bovinos e estimuladas com *L. casei* P054. Os valores apresentados representam média e desvio padrão da média de $2^{\Delta\Delta Ct}$ obtidos pela técnica de qPCR. A) Transcrição relativa de mRNA de IL-4; B) Transcrição relativa de mRNA de IL-10; C) Transcrição relativa de mRNA de IL-2 e D) Transcrição relativa de mRNA de IL-17. (*) indica diferença estatística entre o grupo suplementado com *L. casei* P054 e o grupo controle.

Fonte: realizado pelos autores.

Durante todo o período experimental, os animais suplementados com *L. casei* P054 tiveram ganho médio diário de peso corporal significativamente maior ($p < 0.05$; 560 g/dia) quando comparados aos animais do grupo controle (0,195 kg/ dia).

4 Discussão

Estudos avaliando a atividade imunomoduladora de BAL, particularmente *L. casei* são incipientes em ruminantes. Assim, a presente pesquisa relata a resposta imunomoduladora de bovinos vacinados contra BoHV-1 e suplementados com *L. casei* P054 oriundo de colostro e silagem de colostro bovino.

O conjunto de alunos de microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Departamento de Veterinária Preventiva e Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas,

evidenciaram um resultado satisfatório com a atividade probiótica *in vitro* do isolado *L. casei* P054 utilizado neste estudo (dados não publicados).

Na presente pesquisa evidenciou-se que a suplementação com *L. casei* P054 foi capaz de incrementar a resposta imune à vacina e induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, tanto em esplenócito bovino, como também em PBMCs, comprovando este isolado. Os bovinos vacinados e suplementados com *L. casei* P054 apresentaram nível significativamente superior de IgG anti-BoHV-1 quando comparados ao grupo controle sem suplementação. Estes resultados sugerem que a suplementação com o probiótico pode ser vantajosa, uma vez que foi capaz de induzir um incremento da resposta imune humoral protetora a partir do 7º dia da vacinação primária e mantendo-se superior até o final do experimento. Além disso, os níveis de BoHV-1-IgG específico, principalmente no dia 21, foram semelhantes aos do dia 35, sugerindo que esses animais poderiam ter anticorpos neutralizantes do BoHV-1 aos 21 dias, requer um maior tempo para avaliar a presença de anticorpos neutralizantes. Previamente, Jia et al. (2020) também constataram um aumento na titulação de IgG ao utilizar *L. casei* como adjuvante de uma vacina contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). O BVDV não foi avaliado, pois, a vacina recombinante de *Lactobacillus* fornece proteção imunológica contra a infecção por BVDV, que pode ser eliminada efetivamente pela vacina pós-exposição em animais vacinados por via oral.

No estudo verificou-se que os esplenócitos estimulados com *L. casei* P054 exibiram altos níveis de transcrição de mRNA para as citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17, e níveis relativos similares de transcrição foram observados em PBMCs de bovinos suplementados com este microrganismo. Estes resultados sugerem que a estimulação com *L. casei* P054 induziu a um ambiente favorável para a interação do antígeno vacinal e do sistema imunológico, o que se traduziu no incremento da resposta imunológica humoral e celular à vacina. Essas observações são corroboradas pelos resultados de Jia et al. (2020) que constataram um aumento nos níveis dessas citocinas ao utilizar *L. casei* como adjuvante de uma vacina contra BVDV em camundongos. Esses autores demonstraram o bom desempenho desse microrganismo como probiótico, estimulando a modulação da resposta imune específica, como também apresentou capacidade de colonização intestinal, promovendo o crescimento dos animais experimentais e proteção contra bactérias enteropatogênicas.

Acredita-se que a capacidade dos probióticos em induzir um aumento na resposta imune às vacinas seja decorrente do microrganismo probiótico pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) nas placas de Peyer. A interação de probióticos com APCs ativa linfócitos T virgens, principalmente por meio da secreção de citocinas, em seguida esses linfócitos migram para os linfonodos, em diferentes locais do corpo, onde estimulam a resposta imunológica (HONG et al., 2005; CHIEPPA et al., 2006; LEBEER et al., 2010). Adicionalmente, a estimulação de células imunes e a indução da expressão de citocinas é um fator fundamental para a resposta imunoprotetora à uma vacina (JIA et al., 2020). Segundo Shida et al. (2011) o mecanismo de modulação imunológica probiótica decorre da alteração do perfil de citocinas produzidas no ambiente, onde os antígenos vacinais irão interagir com as células imunológicas.

Os resultados mostraram que *L. casei* P054, estimulou diretamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, sugerindo que o probiótico pode atuar como modulador e regulador da resposta imune, pois a resposta inflamatória corresponde à intensa atividade celular, ao passo que as propriedades anti-inflamatórias regulam esse processo. Neste sentido, Shida et al. (2011) constataram que *L. casei* ao ser fagocitado por monócitos é capaz de estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e TNF, assim como a IL-10 que atua como anti-inflamatória. Esses autores constataram também diferentes padrões de dosagens na curva de resposta e tempo de produção de IL-12 e IL-10, sugerindo que essas interleucinas atuam na imunorregulação da resposta inflamatória, o que aumenta a defesa inata e regula a inflamação.

Os dados do presente estudo demonstraram que a administração de *L. casei* P054 promoveu significativo incremento dos níveis de transcrição de mRNA de IL-2 e IL-17 com aumento de aproximadamente 2,8 e 3,8 vezes superiores ao controle, sendo que a IL-17 foi a citocina que apresentou maiores níveis de expressão, tanto em esplenócitos bovino, como em PBMCs oriundas dos animais suplementados com o probiótico. Essas citocinas são cruciais para a modulação da resposta imune e desencadeamento do processo inflamatório respectivamente (PAPPU et al., 2012; BAYER et al., 2013; WATTEGEDERA et al., 2017).

A IL-2 é sintetizada por células T e está envolvida na maturação de linfócitos T e B (BAYER et al., 2013). Trata-se de uma citocina chave para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, promovendo a proliferação, diferenciação e expansão clonal de células T (ZHOU et al., 2002; GAFFEN; LIU, 2004;) e induzindo a geração

de células T de memória (BACHMANN & OXENIUS, 2007; LI & PAUZA, 2015). Matsuzaki et al. (1998) relataram elevação na síntese de IL-2 em camundongos suplementados com *L. casei*, o que corrobora os dados observados no presente estudo com relação a essa citocina, uma vez que as células que receberam o estímulo com probiótico apresentaram transcrição de mRNA de IL-2 superior ao controle.

A IL-17 é produzida por linfócitos T e células NK, sendo responsável por tornar a resposta imune das mucosas mais efetiva ao desencadear o processo inflamatório, (PAPPU et al., 2012; WATTEGEDERA et al., 2017;). Foi demonstrado que esta citocina não apenas desencadeia a proliferação de linfócitos B, como também promove a formação de centros germinativos e induz a troca de isotipos IgG (MITSDOERFFERA et al. 2010), podendo estar envolvida na indução da produção de anticorpos pelos linfócitos B (MITSDOERFFERA et al., 2010; CAI et al., 2012;).

De acordo com Díaz e Allen (2007) a IL-17 está associada com o desencadeamento de uma resposta TH2. Por outro lado, Morales et al. (2020) sugerem que a IL-17 é importante na manutenção da homeostase intestinal e na regulação das alterações inflamatórias e metabólicas associadas à diabetes do tipo 2.

É importante destacar que o papel da IL-17 pode estar associado à formação de barreiras epiteliais na cavidade bucal, na pele, pulmões, trato gastrintestinal e urogenital, o que permite surtir que seu uso como suplemento na alimentação de bovinos não só incrementa a microbiota intestinal desses animais, como estimula a formação dessa barreira epitelial importante na resposta imune inata (MORALES et al., 2020; DÍAZ e ALLEN, 2007). Adicionalmente, Pappu et al. (2012) apontam a IL-17 como uma das principais citocinas envolvidas na resposta imune frente aos probióticos.

O aumento da transcrição do mRNA das citocinas de IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 permite sugerir que *L. casei* P054 apresenta excelente capacidade imunomoduladora das respostas imunes. Adicionalmente acredita-se que a modulação imunológica do probiótico que resultou em níveis significativamente maiores de IgG total anti-BoHV-1 observados nos bovinos suplementados com o probiótico pode ser decorrente da maior expressão dessas citocinas.

Interessantemente, no presente estudo, os animais suplementados com o probiótico evidenciaram significativo ganho de peso corporal, quando comparados aos animais não suplementados. Estes dados nos permitem supor que, além da ação imunomoduladora observada à resposta vacinal, a administração de *L. casei* P054

também contribuiu para o superior ganho de peso. Previamente, Saalfeld et al. (2013) observaram que a alimentação de bovinos com silagem de colostro, fonte de BAL incluindo *L. casei*, foi capaz de promover o aumento de peso corporal dos animais. Todavia, estes autores atrelaram este resultado a constituição nutricional da silagem de colostro. Em outros estudos que avaliaram o uso de probiótico comercial na alimentação de bovinos, Rasteiro et al. (2007), Arenas et al. (2007) e Terrassi et al. (2010) evidenciaram aumento significativo de ganho de peso vivo dos animais. Os probióticos podem melhorar o desempenho produtivo, mantendo um equilíbrio saudável de bactérias no intestino e atuando por exclusão competitiva contra bactérias patogênicas ou inibindo seu crescimento por meio da produção de ácidos orgânicos, o que melhora o ambiente intestinal e favorece a absorção de nutrientes (ALMEIDA et al., 2013). Bittar et al. (2016) relataram que a suplementação de probiótico na dieta de animais melhora a digestibilidade, tornando mais eficiente o uso dos nutrientes presentes na dieta, o que se reflete em maiores ganhos de peso diário e maior taxa de conversão alimentar.

5 Conclusão

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que a suplementação de bovinos com *L. casei* P054 tem efeito modulador na resposta imune contra a vacina BoHV-1.

Referências

- ABD EL-TAWAB, M. M.; YOUSSELF, I. M. I.; BAKR, H. A.; FTHENAKIS, C. G.; GIADIMIS, N. D. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 4, p. 893–906, 2016.
- ABDOLALIPOUR, E.; MAHOOTI, M.; GORJI, A.; GHAEMI, A. Synergistic therapeutic effects of probiotic *Lactobacillus casei* td-2 consumption on gm-csf-induced immune responses in a murine model of cervical cancer. **Nutrition and Cancer**, p. 1-11, 2020.
- ALMEIDA, S. E. L.; GENARO, C. S.; GEROTI, S. C. T.; GALINA, F. M.; GIUFFRIDA, R.; PARDO, E. P.; PENHA, L.; CAMACHO, R.; SANTOS, O. M. Utilização de probióticos sobre o ganho de peso em bovinos da raça nelore. **Colloquium Agrariae**, v. 9, n. 1, p. 25-30, 2013.

- 439 ARENAS, S. E; REIS, L. S. L. S; PARDO, P. E.; FRAZATTI-GALLINA, N. M.;
 440 FUJIMURA, S. H.; BREMER-NETO, H. Probiotic increase the antirabies humoral
 441 immune response in bovine. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 733-736, 2009.
- 442 BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.;
 443 ZHANG, H. Screening of 369 potential probiotic properties of *Lactobacillus*
 444 *fermentum* isolated from traditional dairy 370 products. **Food Control**, v. 21, p. 695–
 445 701, 2010.
- 446 BAYER, A. L., PUGLIESE, A.; MALEK, T. R. The IL-2/IL-2R system: From basic
 447 science to therapeutic applications to enhance immune regulation. **Immunologic**
 448 **Research**, v. 57, n. 1–3, p. 197–209, 2013.
- 449 BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-
 450 LLORENTE, C.; GIL, A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition &**
 451 **Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.
- 452 BITTAR, C. M.; SILVA, F. L. M.; PAULA, M. R.; SILVA, J. T.; GALLO, M. P. C.;
 453 OLTRAMARI, C. E.; NAPOLES, G. G. O.; SOARES, M. C. Desempenho e
 454 parâmetros sanguíneos de bezerros em sistemas de desaleitamento precoce
 455 suplementados com probióticos de bactérias ruminais. **Revista Brasileira de Saúde**
 456 **Animal**, v. 17, n. 2, p. 249- 261, 2016.
- 457 CAI, G.; NIE, X.; ZHANG, W.; WU, B.; LIN, J.; WANG, H.; JIANG, C.; SHEN, Q. A
 458 regulatory role for il-10 receptor signaling in development and b cell help of t follicular
 459 helper cells in mice. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 3, p. 1294-1302, 2012.
- 460 CASTILLO, N. A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A. M. Oral administration of a probiotic
 461 *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the
 462 immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in
 463 mice. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 177, p. 1-12, 2011.
- 464 CHIEPPA, M.; RESCIGNO, M.; HUANG, A. Y. C.; GERMAIN, R. N. Dynamic imaging
 465 of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell
 466 TLR engagement. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 13, p. 2841-
 467 52, 2006.
- 468 DE MORENO DE LEBLANC, A.; CHAVES, S.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.;
 469 ANTÓINE, J.; PERDIGÓN, G. Effect of long term continuous consumption of
 470 fermented milk containing probiotic bactéria on mucosal immunity and the activity of
 471 peritoneal macrophages. **Immunobiology**, v. 213, n. 2, p. 97-108, 2008.

- 472 DÍAZ, A.; ALLEN, J. E. Mapping immune response profiles : The emerging scenario
473 from helminth immunology. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 12, p.
474 3319–3326, 2007.
- 475 DUMMER, L. A.; ARAUJO, I. L.; FINGER, P. F.; SANTOS, A. G. J.; ROSA, M. C.;
476 CONCEIÇÃO, F. R.; FISCHER, G. S.; VAN DRUNEN, L. D. H.; LEITE, F. P. L.
477 Immune response in mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D.
478 **Vaccine**, v. 32, n. 21, p. 2413-2419, 2014.
- 479 FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization.
480 Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontário, Canadá, 2002,
481 11p.
- 482 FAZEKAS, B.; GROTH, D. S. The presence of interleukin 4 during in vitro priming
483 determines the lymphokine-producing potential of CD4 + T cells from T cell receptor
484 transgenic mice. **Journal of Experiment Medicine**, v. 176, n. 4, p. 1091-1098, 1992.
- 485 FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F.; BECKMANN, M. P.;
486 PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; PAUL, W. E.
487 Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annual Review of**
488 **Immunology**, v. 8, p. 303–333, 1990.
- 489 FONG, F. L. Y.; SHAH, N. P.; KIRJAVAINEN, P.; EL-NEZAMI, H. Mechanism of
490 action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-
491 presenting cells. **International Reviews of Immunology**, v. 25, p. 1-11, 2015.
- 492 FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Immunomodulation by commensal and probiotic
493 bacteria. **Immunological Investigations**, v. 9, n. 4-5, p. 429-48, 2010.
- 494 GADANI, S. P.; CRONK, J. C.; NORRIS, G. T.; KIPNIS, J. Interleukin-4: A cytokine to
495 remember. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 2013.
- 496 GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical
497 applications. **Cytokine**, v. 28, n. 3, p. 109–123, 2004.
- 498 GEHA, R. S.; JABARA, H. H.; BRODEUR, S. R. The regulation of immunoglobulin e
499 class-switch recombination. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 721–32, 2003.
- 500 GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism
501 and functions. **Immunity**, v. 32, p. 593–604, 2010.
- 502 HABIL, N.; AL-MURRANI, W.; BEAL, J.; FOEY, A. D. Probiotic bacterial strains
503 differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and
504 cell subset-specific manner. **Beneficial Microbes**, v. 2, p. 283-293, 2011.

- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.
- HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.
- JIA, S.; HUANG, X.; LI, H.; ZHENG, D.; WANG, L.; QIAO, X.; JIANG, Y.; CUI, W.; TANG, L.; LI, Y.; XU, Y. Immunogenicity evaluation of recombinant *Lactobacillus casei* W56 expressing bovine viral diarrhea virus E2 protein in conjunction with cholera toxin B subunit as na adjuvante. **Microbial Cell Factores**, v. 19, n. 1, p. 186, 2020.
- KARAKAS-SEN, A.; KARAKAS, E. Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 2, p. 985–999, 2018.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Review Microbiology**, v.8, p.171–184, 2010.
- LEITE, F.; KUCKLEBURG, C.; ATAPATTU, D.; SCHULTZ, R.; CZUPRYNSKI, C. J. BHV-1 infection and inflammatory cytokines amplify the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 99, n. 3-4, p. 193-202, 2004.
- MALEK, T. R.; BAYER, A. L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 9, p. 665–674, 2004.
- MANI, S.; AIYEGORO, O.; ADELEKE, M. A. Characterization of rumen microbiota of two sheep breeds supplemented with direct-fed lactic acid bacteria. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, p.57-74, 2021.
- MATSUZAKI, T.; YAMAZAKI, R.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus Casei* strain shirota on immunoglobulin e production in mice. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 48-53, 1998.
- MITSDOERFFER, M.; LEE, Y.; JAGER, A.; KIM, H. J.; KORN, T.; KOLLS, J. K.; CANTOR, H.; BETTELLI, E.; KUCHROO, V. K. Proinflammatory T helper type 17

- 538 cells are effective B-cell helpers. **Proceedings of the National Academy of**
 539 **Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 14292–14297, 2010.
- 540 MOORE, B. B.; MOORE, T. A.; TOEWS, G. B. Role of T- and B-lymphocytes in
 541 pulmonar host defences. **The European Respiratory Journal**, v. 18, n. 5, p. 846–
 542 856, 2001.
- 543 MORALES, J. M. R.; PUIG, L.; DAUDÉN, E.; CAÑETE, J. D.; PABLOS, J. L.;
 544 MARTÍN, A. O.; JUANATEY, C. G.; ADÁN, A.; MONTALBÁN, X.; BORRUEL, N.;
 545 ORTÍ, G.; MARTÍN, E. H.; VIDAL, C. G.; MORALES, C. V.; VÁZQUEZ, V. M.; GAY,
 546 M. A. G. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An
 547 updated review of the evidence focusing in controversies. **Autoimmunity Reviews**,
 548 v.19, 102429, 2020.
- 549 NAKAJIMA, S.; KITOH, A.; EGAWA, G.; NATSUAKI, Y.; NAKAMIZO, S.; MONIAGA,
 550 C. S.; OTSUKA, A.; HONDA, T.; HANAKAWA, S.; AMANO, W.; IWAKURA, Y.;
 551 NAKAE, S.; KUBO, M.; MIYACHI, Y.; KABASHIMA, K. IL-17A as an Inducer for Th2
 552 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. **Journal of Investigative**
 553 **Dermatology**, v. 134, n. 8, p. 2122–2130, 2014.
- 554 PAPPU, R.; RUTZ, S.; OUYANG, W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family
 555 cytokines. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 7, p. 343–349, 2012.
- 556 PAUL, W. E.; ZHU, J.; YAMANE, H. Determination of effector CD4 T cell populations.
 557 **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.
- 558 PLESSAS, S.; NOUSKA, C.; KARAPETSAS, A.; KAZAKOS, S.; ALEXOPOULOS, A.;
 559 MANTZOURANI, I.; CHONDROU, P.; FOURNOMITI, M.; GALANIS, A.;
 560 BEZIRTZOGLU, E. Isolation, characterization and 373 evaluation of the probiotic
 561 potential of a novel Lactobacillus strain isolated from Feta-type 374 cheese. **Food**
 562 **Chemistry**, v. 226, p. 102–108, 2017.
- 563 RASTEIRO, V. S.; PARDO, P. E.; ARENAS, S. E.; BREMER-NETO, H.; OBA, E.;
 564 FRAZZATI-GALLINA, N. M.; REIS, L. S. L. S. Adição de probiótico na mistura
 565 mineral eleva o ganho de peso de bovinos no período da seca. **Asociación**
 566 **Latinoamericana de Producción Animal**, v. 15, n. 3, p. 83-87, 2007.
- 567 ROOS, T. B.; AVILA, L. F. C.; STURBELLE, R. T.; LEITE, F. L. L.; FISCHER, G.;
 568 LEITE, F. P. L. *Saccharomyces boulardii* modulates and improves the immune
 569 response to Bovine Herpesvirus type 5 Vaccine. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
 570 **Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 375-381, 2018.

- 571 SAALFELD, M. H.; PEREIRA, B. I. D.; SILVEIRA, K. R. K.; SCHRAMM, R.;
 572 VALENTE, J. S. S.; BORCHARDT, J. L.; GULARTE, M. A.; LEITE, F. P. L.
 573 Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**,
 574 v. 43, n. 9, p. 1636-1641, 2013.
- 575 SANTOS, F. D. S.; FERREIRA, M. R. A.; MAUBRIGADES, L. R.; GONÇALVES, V.
 576 S.; DE LARA, A. P. S.; MOREIRA, C.; SALVARANI, F. M.; CONCEIÇÃO, F. R.;
 577 LEIVAS LEITE, F. P. *Bacillus toyonensis* BCT-7112T transient supplementation
 578 improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon
 579 toxin. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.
- 580 SHIDA, K.; NANNO, M.; NAGATA, S. Flexible cytokine production by macrophages
 581 and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which
 582 probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. **Gut Microbes**, v. 2, n. 2,
 583 p. 109-14, 2011.
- 584 SILVEIRA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; MENDONÇA, M.; GARCIA MOREIRA, G. M.
 585 S.; DA CUNHA, C. E. P.; CONRAD, N. L.; DE OLIVEIRA, P. D.; HARTWIG, D. D.;
 586 DE LEON, P. M. M.; MOREIRA, Â. N. *Saccharomyces boulardii* improves humoral
 587 immune response to DNA vaccines against leptospirosis. **Journal of Medical**
 588 **Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 184–190, 2017.
- 589 SIM, G. C.; RADVANYI, L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy.
 590 **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 377–390, 2014.
- 591 TANABE, S.; KINUTA, Y.; SAITO, Y. *Bifidobacterium infantis* suppresses
 592 proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium
 593 sulfate-induced intestinal inflammation. **International Journal of Molecular**
 594 **Medicine**, v. 22, p. 181-185, 2008.
- 595 TERRASSI, F. M.; FERES, M. H. M.; CALDO, L. A.; BREMER NETO, H.; PARDO, P.
 596 E. Efeito do probiótico proenzima no peso de bovinos da raça nelore criados em
 597 regime de pasto. **Colloquium Agrariae**, v. 6, n. 2, p. 52-56, 2010.
- 598 VITOLA, H. R. S.; DANNENBERG, G. S.; MARQUES, J. L.; LOPES, G. V.; SILVA,
 599 W. P.; FIORENTINI, A. M. Probiotic potential of *Lactocaseibacillus casei* CSL3
 600 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in
 601 soybean. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 22–30, 2018.
- 602 WATTEGEDERA, S. R.; CORRIPIO-MIYAR, Y.; PANG, Y.; FREW, D.; MCNEILLY,
 603 T. N.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; MCINNES, C. J.; HOPE, J. C.; GLASS, E. J.;

- 604 ENTRICAN, G. Enhancing the toolbox to study IL-17A in cattle and sheep.
605 **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2017.
- 606 ZHOU, X.; MEYER, C. U.; SCHMIDTKE, P.; ZEPP, F. Effect of cordycepin on
607 interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells. **European**
608 **Journal of Pharmacology**, v. 453, n. 2–3, p. 309-317, 2002.

6 Conclusões Finais

- Os resultados deste estudo demonstram que a fermentação anaeróbica do colostro equino até 365 dias de fermentação, mantém os constituintes colostrais avaliados semelhantes ao colostro *in natura*.

- Os resultados do presente estudo indicam que *L. casei* P054 apresenta relevante potencial probiótico *in vitro*.

- *In vitro*, *L. casei* P054 induz efeito imunomodulador em esplenócitos bovino

- A suplementação de bovinos com *L. casei* P054 tem efeito modulador na resposta imune contra a vacina BoHV-1.

Referências

- ABD EL-TAWAB, M. M.; YOUSSELF, I. M. I.; BAKR, H. A.; FTHENAKIS, C. G.; GIADIMIS, N. D. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 4, p. 893–906, 2016.
- ALMEIDA, L.E. GENARO, S.C. GEROTI, T.C. GALINA, N.F. GIUFRIDA, R. PARDO, P.E. Efeito do probiótico na resposta imune humoral em bovinos. **Colloquium Agrariae**, v. 8, n.1 Jan-Jun. 2012, p. 26-35.
- ANDRADE, E. A.; ANSELM, R.; MENDES, C. Q. Silagem de colostro: alternativa sustentável para a bovinocultura leiteira. **SB Rural – Caderno Rural**, n. 49, p. 1-4, 2010.
- AZEVEDO, R. A.; ARAÚJO, L.; COELHO, S. G.; FARIA FILHO, D. R.; DUARTE, E. R.; GERASEEV, L. C. Desempenho de bezerros alimentados com silagem de leite de transição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 545-552, 2013.
- AZEVEDO, R. A.; DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. **REDVET Revista Electrónica de Veterinária**, v. 15, n. 6, p. 84-98, 2014.
- BACHMANN, M. F. & OXENIUS, A. Interleukin 2: From immunostimulation to immunoregulation and back again. **EMBO reports**, v. 8, p. 1142–1148, 2007.
- BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of 369 potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy 370 products. **Food Control**, v. 21, p. 695–701, 2010.
- BATISTA, G. N.; MOREIRA, P. S. A.; OLIVEIRA, L. T.; ROSA, C. C. B.; POLIZEL NETO, A. Avaliação do tempo de armazenamento e composição da silagem de colostro entre duas raças leiteiras: Girolando e Jersey. **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 2, p. 10-16, 2016.
- BAYER, A. L., PUGLIESE, A.; MALEK, T. R. The IL-2/IL-2R system: From basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation. **Immunologic Research**, v. 57, n. 1–3, p. 197–209, 2013.
- BHARWANI, A. MIAN, M.F. FOSTER, J.A. SURETTE, M.G. BIENENSTOCK, J. FORSYTHE, P. Structural & functional consequences of chronic psychosocial stress on the microbiome & host. **Psychoneuroendocrinology**, 64: 217-227, 2016.
- BIERBAUM, G.; SAHL, H. G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.10, p.2–18, 2009. BLOOD, D. C.; RADOSTISTS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263p.
- BORCHER, A. T.; SELMI, C.; MEYERS, F. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. **Journal of Gastroenterology**, v. 44, p. 26–46, 2009.

- BRASIL, C. L.; JUNIOR S. G. S. A.; SANTOS C. A.; PAZINATO M. F.; SILVA C. G.; ETGES H. P. J.; CURCIO R. B.; NOGUEIRA W. C. Utilização do pH do colostro como método previsor do parto em éguas. **Anais XVII Conferência Nacional do Abraceq**, n. 135, p. 214, 2016.
- BRASIL, C. L.; JUNIO S. G. S. A.; PAZINATO, F. M, VALENTE, J. S; ZAMBRANO, C. G; ETGES, J. P. H.; NOGUEIRA, C. E. W. Colostro equino: importância dos principais constituintes físico-químicos. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, v. 12, p. 4-11, 2017.
- BUTS, J. P.; KEYSER, N. D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Disease and Sciences**, v. 51, n. 8, p. 1485-1492, 2006.
- CAI, G.; NIE, X.; ZHANG, W.; WU, B.; LIN, J.; WANG, H.; JIANG, C.; SHEN, Q. A regulatory role for il-10 receptor signaling in development and b cell help of t follicular helper cells in mice. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 3, p. 1294-1302, 2012.
- CANISSO, I. F.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H.; SILVA, E. S. M.; DAVOLLI, G. M. Decreasing pH of mammary gland secretions is associated with parturition and is correlated with electrolyte concentrations in pre-foaling mares. **Veterinary Record**, v. 173, n. 9, p.218, 2013.
- CHIEPPA, M.; RESCIGNO, M.; HUANG, A. Y. C.; GERMAIN, R. N. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 13, p. 2841-52, 2006.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, v.33, n.4, 2010.
- COPOLLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v. 16, p. 213-219, 2005.
- CSAPÓ, J.; STEFLER, J.; MARTIN, T. G.; MAKRAY, S.; CSAPO-KISS, Z. S. Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 4, p. 393-342, 1995.
- DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, an management the young calf**. Ames: Iowa State University Press, 1998. 339 p.
- DE MORENO DE LEBLANC, A.; CHAVES, S.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; ANTÓINE, J.; PERDIGÓN, G. Effect of long term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. **Immunobiology**, v. 213, n. 2, p. 97-108, 2008.
- DESBOIS, A. P. & SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629-42, 2010.

- DÍAZ, A. & ALLEN, J. E. Mapping immune response profiles : The emerging scenario from helminth immunology. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 12, p. 3319–3326, 2007.
- ERIKSON, L. K. & HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 403-109, 2000.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontário, Canadá, 2002, 11p.
- FAZEKAS, B.; GROTH, D. S. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4 + T cells from T cell receptor transgenic mice. **Journal of Experiment Medicine**, v. 176, n. 4, p. 1091-1098, 1992.
- FERREIRA, L. A.; PARDO, P. E; FRAZATTIGALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; VENTINI, D. C.; KRONKA, S. N.; ARENAS, S. E.; REIS, L. S. L. S. Avaliação da vacinação antirábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 655- 660, jul./set., 2009.
- FERNANDES, G.R. **Aplicações tecnológicas atuais e potenciais no mercado para alimentos probióticos**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biosistemas. Sete Lagoas – MG, 2013.
- FIDLER, A. P.; ALLEY, M. L.; SMITH, G. W. Short communication: serum immunoglobulin G and total protein concentrations in dairy calves fed a colostrum replacement product. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3609- 3612, 2011.
- FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F.; BECKMANN, M. P.; PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; PAUL, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 303–333, 1990.
- FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrums: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1033-1060, 1978.
- FONTANA, A. ZACCONI, C. MORELLI, L. Genetic signatures of dairy Lactobacillus casei group. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2611, 2018.
- FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. In: **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 413p.
- GADANI, S. P.; CRONK, J. C.; NORRIS, G. T.; KIPNIS, J. Interleukin-4: A cytokine to remember. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 2013.

- GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, n. 3, p. 109–123, 2004.
- GARCIA, F.; GONZALEZ, F. Y.; MUNÖZ, G. Preservacion de calostro, I. Efecto de aditivos orgânicos. **Ciência e Investigação Agrária**, v. 8, n. 2, 1981.
- GEHA, R. S.; JABARA, H. H.; BRODEUR, S. R. The regulation of immunoglobulin e class-switch recombination. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 721–32, 2003.
- GEORGIEV, I. P. Alterations in chemical composition of colostrum in relationship to post partum time. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 35-39, 2005.
- GIBSON, G. R.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R. A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 31-34, 2005.
- GIGUERE, S. & POLKES, A. C. Immunologic disorders in neonatal foals. **Veterinary Clinica of North America – Equine Practice**, v. 21, p. 241-266, 2005.
- GODDEN, S. M. Microbial Hazards associated with feeding colostrum to calves. **Annual Mtg. Southwest Nutrition and Management Conference**, Tempe, AZ, p. 26-27, 2009.
- GODDEN, S. M.; SMOLENSKI, D. J.; DONAHUE, M.; OAKES, J. M.; BEY, R.; SREEVATSAN, S.; STABELAND, J.; FETROW, J. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 4029-40, 2012.
- GÓMEZ-LLORENTE, C.; MUNOZ, S.; GIL, A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotic. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, p. 381–389, 2010.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, p. 593–604, 2010.
- HERICK, R. & LEVKUT, M. Lactic acid bacteria, probiotic and immune system. **Veterinary Medicine – Czech**, v. 47, p. 169-180, 2002.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.
- HILL, D. SUGRUE, I. TOBIN, C. HILL, C. STANTON, C. ROSS, R. P. The Lactobacillus casei group: History and health related applications. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2107, 2018.

- HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.
- HOWE, P. E. An effect of the ingestion of colostrum upon the composition of the blood of new born calves. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 115-118, 1921.
- HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 442–474, 2011.
- JAINUDEEN, M. R & HAFEZ, E. S. E. **Ciclos reprodutivos: Bovinos e Bubalinos**. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7ª ed. São Paulo: Manole, 2004, p.159-171.
- JEFFCOTT, L. B. Studies on passive immunity in the foal 1. Gamma-globulin and antibody variations associated with maternal transfer of immunity and the onset of active immunity. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.84, p.93-101, 1974.
- JIA, S.; HUANG, X.; LI, H.; ZHENG, D.; WANG, L.; QIAO, X.; JIANG, Y.; CUI, W.; TANG, L.; LI, Y.; XU, Y. Immunogenicity evaluation of recombinant *Lactobacillus casei* W56 expressing bovine viral diarrhea virus E2 protein in conjunction with cholera toxin B subunit as na adjuvante. **Microbial Cell Factores**, v. 19, n. 1, p. 186, 2020.
- KANDA, B. BUENO, L.A. LUTZ, M.F. DELLALIBERA-JOVILIANO, R. Análise das Células do Sistema Imune Inato e Adaptativo Em Modelos Experimentais de Ratos Wistars Tratados com Decanoato de Nandrolona. **Revista EPeQ/Fafibe**, 1ª. Ed., vol.01, p. 08-17, 2009.
- KARAKAS-SEN, A.; KARAKAS, E. Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 2, p. 985–999, 2018.
- KEHOE, S. I.; JAYARAO, B. M.; HEINRICHS, A. J. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4108-4116, 2007.
- KOTERBA, A. M.; DRUMOND, W. H.; KOSCH, P. C. **Equine clinical neonatology**, 1ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990, 846p.
- KURALKAR, P.; KURALKAR, S.V. Nutritional and immunological importance of colostrum for the new born. **Veterinary World**, v. 3, n. 1, p. 46-47, 2010.
- LANG, A.; SOUZA, M. V.; SALCEDO, J. H. P.; SOSSAI, S.; ARAÚJO, R. R.; LOURENÇO, G. G.; LEANDRO, M. Imunidade passiva em equinos: Comparação entre a concentração de IgG do soro materno, colostro e soro do neonato. **Bibliotheca Anatomica**, v. 54, p. 405-411, 2007.
- LARSON, B. L.; LEARY, H. L.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production by the mamary gland. **Journal Dairy Science**, v. 63, p. 665, 1980.

- LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; LONIGRO, S. L.; DE ANGELIS, M.; MORELLI, L.; CALLEGARI, M. L.; RIZZELLO, C. G.; VISCONTI, A. Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4233–4240, 2005.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Review Microbiology**, v. 8, p. 171–184, 2010.
- LEBLANC, M. M.; McLAURIN, B. I.; BOSWELL, R. Relationship among serum immunoglobulin concentration in foals, colostral specific gravity, and colostral immunoglobulin concentration. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 57-60, 1986.
- LI, H. & PAUZA, C. D. CD25+Bcl6low T follicular helper cells provide help to maturing B cells in germinal centers of human tonsil. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 298–308, 2015.
- LIERMANN, W.; SCHÄFF, C. T.; GRUSE, J.; DERNO, M.; WEITZEL, J. M.; KANITZ, E.; OTTEN, W.; HOEFELICH, A.; STEFANIAK, T.; SAUERWEIN, H.; BRUCKMAIER, R. M.; GROSS, J. J.; M. HAMMON, H. Effects of colostrum instead of formula feeding for the first 2 days postnatum on whole-body energy metabolism and its endocrine control in neonatal calves. **Journal Dairy Science**, v. 103, p. 3577–3598, 2020.
- LUZ, I. N. C.; ALDA, J. L.; SILVA, J. H. S.; DE LA CORTE, F. D.; SILVA, C. A. M. Viscosidade, a coloração e a gravidade específica do colostro no prognóstico da concentração de imunoglobulina sérica de potros recém-nascidos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 3, p. 299-305, 1992.
- MAKRAS, L.; TRIANTAFYLLOU, V.; FAYOL-MESSAOUDI, D.; ADRIANY, T.; ZOUMPOPOULOU, G.; TSAKALIDOU, E.; SERVIN, A.; DE VUYST, L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 241–247, 2006.
- MALDONADO GALDEANO, C.; CAZORLA, S. I.; LEMME DUMIT, J. M.; VÉLEZ, E.; PERDIGÓN, G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, p. 115–124, 2019.
- MALDONADO, N. C.; NADER-MACIAS, M. E. F. Production of fermented milk with autochthonous *Lactobacilli* for newborn calves and resistance to the dairy farm conditions. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 6, n. 4, p. 1-5, 2016.
- MALEK, T. R. & BAYER, A. L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 9, p. 665–674, 2004.

- MANI, S.; AIYEGORO, O.; ADELEKE, M. A. Characterization of rumen microbiota of two sheep breeds supplemented with direct-fed lactic acid bacteria. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 57-74, 2021.
- MARNILA, P.; KORHONEN, H. **Immunoglobulins**. Encyclopedia of Dairy Sciences, London, 2002, 1950-1956p.
- MARTINS, A. K. S.; MARTINS, F. S.; GOMES, D. A.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; CARA, D. C.; NARDI, R. M. D.; NICOLI, J. R. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. lactis. **Archives of Microbiology**, v. 192, p. 995–1003, 2010.
- MASSEY, R. E.; LEBLANC, M.; KLAPSTEIN, E. Colostrum feeding of foals and colostrum banking. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 37, p. 1-8, 1991.
- MBOW, M. L.; DE GREGORIO, E.; VALIANTE, N. M.; RAPPUOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 411–416, 2010.
- MCGUIRE, T. C.; POPPIE, M. J.; BANKS, K. L. Hypogammaglobulinemia predisposing to infections in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 166, p. 1138-1140, 1975.
- MCGUIRK, S.; COLLINS, M. Managing the production, storage and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 20, p. 593–603, 2004.
- MINELLI E. B.; BENINI A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 20, p. 180-183, 2008.
- MITSDOERFFER, M.; LEE, Y.; JAGER, A.; KIM, H. J.; KORN, T.; KOLLS, J. K.; CANTOR, H.; BETTELLI, E.; KUCHROO, V. K. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 14292–14297, 2010.
- MOORE, B. B.; MOORE, T. A.; TOEWS, G. B. Role of T- and B-lymphocytes in pulmonar host defences. **The European Respiratory Journal**, v. 18, n. 5, p. 846–856, 2001.
- MORALES, J. M. R.; PUIG, L.; DAUDÉN, E.; CAÑETE, J. D.; PABLOS, J. L.; MARTÍN, A. O.; JUANATEY, C. G.; ADÁN, A.; MONTALBÁN, X.; BORRUEL, N.; ORTÍ, G.; MARTÍN, E. H.; VIDAL, C. G.; MORALES, C. V.; VÁZQUEZ, V. M.; GAY, M. A. G. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. **Autoimmunity Reviews**, v.19, 102429, 2020.
- MORIN, D. E; McCOY, G. C; HURLEY, W. L. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin

- G1 absorção in Holstein bull calves. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 4, p. 747-753, 1997.
- MORRIL, K. M.; CONRAD, E.; LAGO, A.; CAMPBELL, J.; QUIGLEY, J.; TYLER, H. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3997-4005, 2012.
- NOGUEIRA, C. E. W.; LINS, L. A. **Neonatologia e pediatria eqüina**, 1 ed., v.1. Pelotas: Gráfica UFPel, 2009, 173p.
- OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions—A review. **International Journal Medical Microbiology**, v. 300, p. 57–62, 2010.
- PAPPU, R.; RUTZ, S.; OUYANG, W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 7, p. 343–349, 2012.
- PAUL, W. E.; ZHU, J.; YAMANE, H. Determination of effector CD4 T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.
- PAULETTI, P.; BAGALDO, A. R.; KINDLEIN, L.; DE PAZ, C. C. P.; LANNA, D. P. D.; MACHADO NETO, R. IGF-I e IgG séricos e nas secreções lácteas em vacas tratadas com rbST no período pré-parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 976–986, 2005.
- PELUSO, I.; FINA, D.; CARUSO, R.; STOLFI, C.; CAPRIOLI, F.; FANTINI, M. C.; CASPANI, G.; GROSSI, E.; DI IORIO, L.; PAONE, F. M.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1730-1737, 2007.
- PENHA, L. A. C; PARDO, P. E; BREMER-NETO, H. Effects of probiotic supplementation on live weight gain and serum cortisol concentration in cattle. **Veterinary Record**, v. 168, p. 538, 2011.
- PERKINS, G. A.; GOODMAN, L. B.; WIMER, C.; FREER, H.; BABASYAN, S.; WAGNER, B. Maternal T-lymphocytes in equine colostrum express a primarily inflammatory phenotype. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 161, n. 3-4, p. 141-150, 2014.
- PIKUL, J.; WOJTOWSKI, J. Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mares' colostrums and milk during five lactation months. **Livestock Science**, v. 113, n. 2-3, p. 285-290, 2008.
- PLESSAS, S.; NOUSKA, C.; KARAPETSAS, A.; KAZAKOS, S.; ALEXOPOULOS, A.; MANTZOURANI, I.; CHONDROU, P.; FOURNOMITI, M.; GALANIS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Isolation, characterization and 373 evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type 374 cheese. **Food Chemistry**, v. 226, p. 102–108, 2017.
- PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. 1 ed. Rio de Janeiro, Br: Guanabara Koogan, 2006, 241p.

- PRIESTLEY, D. ; BITTAR, J. H.; IBARBIA, L.; RISCO, A. A.; GALVÃO, K. N. Effect of feeding maternal colostrum or plasma-derived or colostrum-derived colostrum replacer on passive transfer of immunity, health, and performance of preweaning heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 3247-3256, 2013.
- QADIS, A. Q.; GOYA, S.; YATSU, M.; YOSHIDA, Y.U.; ICHIJO, T.; SATO, S. Efeitos de um probiótico baseado em bactérias em subpopulações de leucócitos periféricos e sua expressão de mRNA de citocinas em bezerros. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, p. 189–195, 2014.
- QUIGLEY, J. The role of oral immunoglobulins in systemic and intestinal immunity of neonatal calves. **Diamond V Mills, Cedar Rapid**, 2004.
- RADOSTISTS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1772p.
- REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, 2009.
- REIS, A. P.; MESQUITA, A. J.; SANTOS, K. R. P.; OLIVEIRA, F. H.; BALDUINO, R.; MACIEL, I. B.; SILVA, E. B.; NICOLAU, E. S. Avaliação da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 204-212, 2009.
- ROA, I.; SMOK, C.S.; PRIETO, R. G. Placenta: anatomía e histología comparada. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 4, p. 1490-1496, 2012.
- ROBINSON, S. & FALL, C. Infant nutrition and later health: a review of current evidence. **Nutrients**, v. 4, p. 859–874, 2012.
- ROOS, T.B.; DE LARA, A. P. S. S.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEIVAS LEITE, F. P. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v.30, p.2173-2177, 2012.
- ROSA, L.F.R.B.C. VAISBERG, M.W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev Bras Med Esporte**, Vol. 8, Nº 4 – Jul/Ago, 2002.
- RUSSELL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances Microbial Physiology**, v. 39, p. 205–234, 1998.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SAALFELD, M. H.; PEREIRA, D. I. B.; SILVEIRA, K. R. K.; DINIZ, G. L.; KRINGEL, D. H.; ALVES, M. I.; GULARTE, M. A.; LEITE, F. P. L. Colostro: A redescoberta de

um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 5, n. 2, p. 18-24, 2012.

SAALFELD, M. H. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras. **A Hora Veterinária**, v. 162, p. 59-62, 2008.

SAALFELD, M. H.; PEREIRA, B. I. D.; SILVEIRA, K. R. K.; SCHRAMM, R.; VALENTE, J. S. S.; BORCHARDT, J. L.; GULARTE, M. A.; LEITE, F. P. L. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1636-1641, 2013.

SAALFELD, M. H.; PEREIRA, D. I. B.; BORCHARDT, J. L.; STURBELLE, R. T.; ROSA, M. C.; GUEDES, M. C.; GULARTE, M. A.; LEITE, F. P. L. Evaluation of the transfer of immunoglobulin from colostrum anaerobic fermentation (colostrum silage) to newborn calves. **Animal Science Journal**, v. 85, p. 963-967, 2014.

SALAMON, R. V.; SALAMON, S. Z.; CSAPO-KISS, Z. S.; CSAPO, J. Composition of mare's colostrum and milk I. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents. **Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria**, v. 2, n. 1, p. 119-131, 2009.

SALIMEI, E.; FANTUZ, F. Equid milk for human consumption. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 130-142, 2012.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, p. 91-99, 2003.

SANTOS, E. M. & ZANINE, A. M. Silagem de gramíneas tropicais. **Colloquium Agrariae**, v. 2, n.1, p. 32-45, 2006.

SANTOS, F. D. S.; FERREIRA, M. R. A.; MAUBRIGADES, L. R.; GONÇALVES, V. S.; DE LARA, A. P. S.; MOREIRA, C.; SALVARANI, F. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEIVAS LEITE, F. P. *Bacillus toyonensis* BCT-7112T transient supplementation improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

SCHACHTSIEK, M.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein CPF mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. **Applied Environment Microbiology**, v. 70, p. 7078–7085, 2004.

SHIDA, K.; NANNO, M.; NAGATA, S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. **Gut Microbes**, v. 2, n. 2, p. 109-14, 2011.

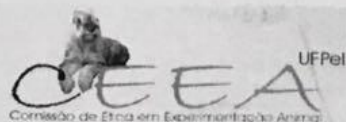
SIDIRA, M. GALANIS, A. YPSILANTIS, P. KARAPETSAS, A. PROGAKI, Z. SIMOPOULOS, C. Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 19(4), 224–230, 2010.

- SILVA, E. S. M.; SCALCO, E. M.; LAMBERTI, M. S.; SURIAN, C. R. S.; PUOLI-FILHO, J. N. P. Cuidados com o potro órfão: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 21, p. 15, 2013.
- SIM, G. C.; RADVANYI, L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 377–390, 2014.
- SIMON, B. B. Z.; RONCATI, N. V.; HOGE, A. Y. A.; PORTO, A. C. R. C. Perfil celular do colostro de éguas: estudo preliminar. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 2-3, p. 32–36, 2012.
- SMITH, T.; LITTLE, R. B. Cow serum as a substitute for colostrum in new-born calves. **Journal of Experimental Medicine**, v.36, p. 181-198, 1922.
- SOLIMAN, A. H. S.; SHAROBA, A. M.; BAHLOL, H. E. M.; SOLIMAN, A. S.; RADI, O. M. M. Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 10-18, 2015.
- STARBUCK, G. R. Physiology of lactation in the mare. **Nutrition and Feeding the broodmare**, v.120, p. 49 - 55, 2006.
- STEWART, S.; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R. SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L.; MUELLER, K.; FERROUILLET, C. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2571-2578, 2005.
- SUPERTI, F. Lactoferrin from bovine milk: a protective companion for life. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2562, 2020.
- TAHMASBI, A. M.; ABADI, S. H. J.; NASERIAN, A. A. the effect of two liquid feeds and two sources of protein in starter on performance and blood metabolites in Holstein neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 363-371, 2014.
- TALUKDER, M. J. R.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 514–524, 2002.
- THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. **Gut Microbes**, v. 1, n. 3, p. 148-163, 2010.
- TIPTIRI-KOURPETI, A. SPYRIDOPOULOU, K. SANTARMAKI, V. AINDELIS, G. TOMPOULIDOU, E. LAMPRIANIDOU, E.E. SAXAMI, G. YPSILANTIS, P. LAMPRI, E.S. SIMOPOULOS, C. KOTSIANIDIS, I. GALANIS, A. KOURKOUTAS, Y. DIMITRELLOU, D. CHLICHIA, K. *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effect accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinomacells. **PloS One**, 11(2), Article e0147960, 2016.

- 1 TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: Uma introdução**. 6 ed. São Paulo: R., 2002.
2 568p.
3
- 4 UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of probiotics/prebiotics on
5 cattle health and productivity. **Microbes Environment**, v. 30, p. 126–132, 2015.
6
- 7 VÉLEZ, M. P.; VERHOEVEN, T. L. A.; DRAING, C.; VON AULOCK, S.;
8 PFITZENMAIER, M.; GEYER, A.; LAMBRICHTS, I.; GRANGETTE, C.; POT, B.;
9 VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Functional analysis of D-
10 alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG.
11 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3595–3604, 2007.
12
- 13 VIRGINIO JÚNIOR, G. F.; DUARTE, E. R.; ORNELAS, L. T. C.; AZEVEDO, R. A.;
14 PINTO, M. S.; GERASEEV, L. C. Caracterização físico-química e microbiológica do
15 fluido ruminal e do conteúdo gastrointestinal de bezerros alimentados com silagem
16 de leite de transição. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 2, p. 142-
17 147, 2016.
18
- 19 WATTEGEDERA, S. R.; CORRIPIO-MIYAR, Y.; PANG, Y.; FREW, D.; MCNEILLY,
20 T. N.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; MCINNES, C. J.; HOPE, J. C.; GLASS, E. J.;
21 ENTRICAN, G. Enhancing the toolbox to study IL-17A in cattle and sheep.
22 **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2017.
23
- 24 WATTIAUX, M. A. **Essências em gado de leite**. Do nascimento a desmama
25 University of Wisconsin-Madison, 1994.
26
- 27 WYNN, S. G. Probiotics in veterinary practice. **Journal of the American Veterinary**
28 **Medicine**, v. 234, n. 5, p. 606-613, 2009.
29
- 30 ZHENG, J. WITTOUCK, S. SALVETTI, E. FRANZ, C.M.A.P. HARRIS, H.M.B.
31 MATTARELLI, P. O'TOOLE, P.W. POT, B. VANDAMME, P. WALTER, J.
32 WATANABE, K. WUYTS, S. FELIS, G.E. GANZLE, M.G. LEBEER, S. A taxonomic
33 note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended
34 description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of lactobacillaceae
35 and leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary**
36 **Microbiology**, 70(4), 2782–2858, 2020.
37
- 38 ZHOU, X.; MEYER, C. U.; SCHMIDTKE, P.; ZEPP, F. Effect of cordycepin on
39 interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells. **European**
40 **Journal of Pharmacology**, v. 453, n. 2–3, p. 309-317, 2002.

Anexo

Anexo A: Documento de aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal-UFPeI



Pelotas, 20 de outubro de 2017

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade probiótica *ex vivo* de bactérias ácido lácticas isoladas a partir da silagem de colostro bovino**” processo número 23110.008224/2017-74, de responsabilidade de **Daniela Isabel Brayer Pereira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 02/10/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	21/10/2017 a 01/09/2019
Espécie/linhagem/raça	Bovina/ Hereford e Braford
Nº de animais	30
Idade	30 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Fazenda Nossa Senhora Auxiliadora – Bagé/RS

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEE A 8224-2017**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2017

Assinatura do Professor Responsável: _____