

EFEITO DO *Enterococcus faecium* E *Saccharomyces cerevisiae* NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E GANHO DE PESO DE BEZERROS ALIMENTADOS COM SILAGEM DE MILHO

Gabriel Vinicius Bet Flores¹
Gabriela Rodrigues Thomaz¹
Willi Horner Netto¹
Patricia Santos Rossi¹
Felipe Strickler¹
Heloisa Godoi Bertagnon²
Meire Christina Seki¹
Adriano de Oliveira Torres Carrasco¹

RESUMO

O uso de probióticos a base de leveduras melhora o ganho de peso e o sistema imunológico de bovinos frente a grandes desafios imunológicos, no entanto permanece a dúvida se seu uso também apresentaria efeito em desafios mais tênues. Desta maneira, o presente trabalho verificou se o uso de probiótico a base de *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* via oral interfere na imunidade inata e no peso de bezerros saudáveis, em fase de crescimento, alimentados principalmente com silagem de milho. Para tanto, 12 bezerros da raça Jersey (120 kg \pm 50 kg e 4-7 meses de idade), foram alocados nos grupos controle (n=6) ou tratamento (n=6), de acordo com a oferta de probiótico (2g/dia, via oral) durante 45 dias. Nos dias 0, 15, 30 e 45, os animais foram submetidos a pesagens, exames clínicos, e colheita de sangue para realização de hemograma e mensuração do metabolismo oxidativo neutrofílico. Observou-se que, o probiótico promoveu pequeno e pontual incremento na função neutrofílica sanguínea (P=0,10, D15), incremento nos valores de hematócrito e hemoglobina (P=0,03 e 0,05, D45), além de maior ganho de peso nas fases iniciais da administração do suplemento (P=0,05), permitindo concluir que o suplemento é benéfico para animais em fase de adaptação de trocas de dieta e de manejo, mesmo quando estes desafios são tênues.

Palavras-Chave: probiótico; levedura; neutrófilo; ERO (espécie reativa de oxigênio); NBT (nitroazul de tetrazolium)

EFFECT OF THE *Enterococcus faecium* AND *Saccharomyces cerevisiae* IN THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE, HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND BODY WEIGHT OF CALVES FED WITH CORN SILAGE

ABSTRACT

The use of yeast probiotics improves body weight gain and the immune system of cattle submitted to husbandry challenges, however the question remains whether the probiotics could have an effect on more tenuous challenges. In this way, the present study verified if the use of probiotic (*Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae*) provided orally, interferes with the innate immunity and body weight of calves fed mainly with corn silage. Twelve Jersey calves (120 kg \pm 50 kg and 4-7 months of age) were allocated to the control (n = 6) or treatment (n = 6) group according to the probiotic supply (2 g / day, orally) for 45 days. On days 0, 15,

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste

² Universidade Estadual do Centro Oeste. Correspondência: hbertagnon@hotmail.com

30 and 45, the animals were weighted, and submitted to clinical examinations, and blood collection for hemogram and measurement of neutrophil oxidative metabolism. It was observed that the probiotic promoted a slight and punctual increase in blood neutrophilic function ($P = 0.10$, D15), increased hematocrit and hemoglobin values ($P = 0.03$ and 0.05 , D45) and increased the body weight gain in the initial phases of supplementation ($P = 0.08$), allowing to conclude that the probiotic is beneficial for animals in the adaptation phase of diet changes and management, even when these challenges are mild.

Keywords: probiotics; yeast; neutrophil; ROS (reactive oxygen species); NBT (nitro blue tetrazolium)

EFEECTO DE *Enterococcus faecium* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA, PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y GANANCIA DE PESO DE TERNEROS ALIMENTADOS CON ENSILAJE DE MAÍZ.

RESUMEN

El uso de probióticos de levadura mejora el aumento de peso corporal y el sistema inmunológico del ganado sometido a los desafíos de la cría, sin embargo, la pregunta sigue siendo si los probióticos podrían tener un efecto en desafíos más tenues. De esta manera, el presente estudio verificó si el uso de probióticos (*Enterococcus faecium* y *Saccharomyces cerevisiae*) proporcionado por vía oral interfiere con la inmunidad innata y el peso corporal de los terneros alimentados principalmente con ensilaje de maíz. Doce terneros de Jersey ($120 \text{ kg} \pm 50 \text{ kg}$ y 4-7 meses de edad) se asignaron al grupo control ($n = 6$) o tratamiento ($n = 6$) según el suministro de probióticos (2 g / día , por vía oral) para 45 días. En los días 0, 15, 30 y 45, los animales se pesaron y se sometieron a exámenes clínicos y se recogieron muestras de sangre para el hemograma y la medición del metabolismo oxidativo de los neutrófilos. Se observó que el probiótico promovió un aumento leve y puntual de la función neutrofílica en sangre ($P = 0,10$, D15), aumento de los valores de hematocrito y hemoglobina ($P = 0,03$ y $0,05$, D45) y aumento de la ganancia de peso corporal en las fases iniciales de la suplementación. ($P = 0.08$), lo que permite concluir que el probiótico es beneficioso para los animales en la fase de adaptación de los cambios y el manejo de la dieta, incluso cuando estos desafíos son leves.

Palabras clave: probiótico; levadura; neutrófilo, EOR (especies de oxígeno reactivas); NBT (nitroazul tetrazolium)

INTRODUÇÃO

A região sul do Brasil possui estações meteorológica bem definidas entre o inverno e verão, o que gera períodos de vazio forrageiros resultando em diminuição da oferta de forragem para bovinos. Assim, a suplementação com alimentos conservados, na forma de silagem ou feno, é uma prática rotineira na criação de bovinos. Porém os processos de ressecamento e de ensilagem podem reduzir o teor de nutrientes da pastagem, o que por sua vez, pode comprometer as funções imunológicas dos bovinos, tornando-os mais susceptíveis a enfermidades infecciosas (1).

Tal entrave costuma ser solucionado pelo uso de imunostimulantes injetáveis, como as vitaminas E ou ADE, tanto no intuito de aumentar a produtividade(2,3), como para prevenir ocorrência de doenças, já que estimula os processos de fagocitose e metabolismos oxidativo neutrofílico(4,5).

No entanto, o uso de medicamentos injetáveis requer a contenção dos animais para a aplicação dos produtos, o que além de laborioso, pode gerar traumas, decorrentes da contenção, dor no local de aplicação e reações locais. Uma alternativa seria o uso de suplementos alimentares, administrados diariamente na alimentação dos bovinos. Entre os vários aditivos existentes no mercado, cita-se os probióticos, que são micro-organismos vivos ou preparados destes, em número suficiente para alterar o microbioma gastrointestinal por implantação ou colonização dos compartimentos gástricos do hospedeiro, promovendo benéficos na saúde do mesmo (6).

Os probióticos a base de leveduras, associadas ou não ao *Enterococcus* sp., têm sido utilizados na dieta de bovinos confinados com dietas energéticas, com o intuito aumentar a microbiota ruminal celulolítica, estabilizando o pH ruminal e, assim, atenuando a ocorrência da síndrome da acidose ruminal subaguda (SARA) e seus efeitos nos diferentes órgãos como rúmen, fígado, sistema podal e sistema imunológico(7).

Já em bezerros lactentes, estes probióticos colonizam os intestinos, mantendo seu pH mais baixo, o qual viabiliza o estabelecimento da microbiota intestinal não patogênica e impede o crescimento da patogênica. Este mecanismo diminui a ocorrência de diarreia, o que por sua vez resulta em maior ganho de peso, melhora a eficiência alimentar e a imunidade de bezerros(8,9).

Em relação a imunidade, não se tem ainda um consenso sobre os reais benefícios que os probióticos a base de *E. faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* promovem. Enquanto Qadis *et al.*(10) e Fomenky *et al.*(11), notaram que o probiótico aumentou a imunidade inata de bezerros. Roodposhti e Dabiri(12) só verificaram influência do produto no ganho de peso diário e na diminuição da eliminação fecal de *E. coli* patogênica, mas não na imunidade de bezerras lactantes.

Embora o uso de *S. cerevisiae* tem ação positiva em períodos de grande desafio imunológico, como mudança de lotes, desmame, parto, diarreias ou síndrome de acidose ruminal aguda (SARA), fortalecendo a resposta imunológica por ativação das células de defesa (células NK e fagocíticas) (7,10,11,13), permanece a dúvida se seu uso também apresentaria efeito em desafios mais tênues, como bezerros sadios em fase de crescimento, alimentados principalmente com silagem de milho em fase de período de transição de pastagem de inverno para pastagem de verão.

Desta maneira, o presente trabalho pretende verificar se o uso de probiótico a base de *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* via oral interfere na imunidade inata e no peso de bezerros sadios, alimentados principalmente com silagem de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais da UNICENTRO, protocolo 025/2018.

O experimento foi realizado com 12 bezerros da raça Jersey, de ambos os sexos, sadios, com peso médio de 120 kg (± 50), e idade média inicial de 5-7 meses. Estes animais formaram dois grupos homogêneos de seis animais cada, nos quais o grupo controle (GC) não recebeu nenhum probiótico, enquanto o grupo tratamento (GT) recebeu 2g do probiótico contendo *Enterococcus faecium* (Mín. $2,5 \times 10^9$ UFC/g) e *Saccharomyces cerevisiae* (Mín. $1,0 \times 10^9$ UFC/g) (Probios precise, Ouro Fino, São Paulo), conforme recomendação do fabricante.

Esses animais pertenciam à Unidade Didática de Bovinocultura de Leite da UNICENTRO, permanecendo em piquetes em época de vazio forrageiro, sendo alimentados com silagem de milho (1 kg/animal- tabela 1) e fornecimento de água *ad libitum*. Como critério de inclusão, os animais foram vermifugados e passaram por exame clínico completo e

hemograma dois dias antes do experimento, a fim de garantir que estivessem livres de doenças na entrada do período experimental.

Tabela 1. Composição química da silagem de milho utilizados na alimentação dos animais.

Parâmetro	Silagem de milho
Matéria seca %	37,17
Matéria mineral %MS	3,95
Proteína bruta % MS	7,79
Extrato etéreo % MS	3,47
Fibra detergente neutra % MS	55,65
Fibra detergente ácida % MS	30,02
NDT % MS	66,86

Os animais do GC receberam diretamente na boca 2 g de farelo de milho, mimetizando o manejo do grupo tratado, e os animais do GT receberam 2g de probiótico, durante 45 dias. Nos dias 0, 15, 30 e 45 os animais foram submetidos a pesagens, exames clínicos e análises imunológicas.

As pesagens foram realizadas com balança móvel (Balanças Açores®, modelo 602sm), as 8:00 da manhã, antes de receberem a silagem de milho. Posteriormente os animais foram submetidos ao exame clínico através da avaliação das funções vitais, conforme preconizado por Feitosa(14).

Para as avaliações imunes, colheu-se sangue da veia jugular externa, em tubos com anticoagulante EDTA, para realização do hemograma, e com heparina, para realização do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. O hemograma foi realizado em analisador automático de células (SDH-3 VET, Labtest) e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos, analisados em microscopia ótica de acordo com as características morfotintoriais.

Para as avaliações do metabolismo oxidativo, os tubos de sangue foram refrigerados até o processamento, não extrapolando um tempo de três horas entre a colheita e o processamento. A técnica utilizada foi a colorimétrica de redução do tetrazolio nitroazul (NBT), de acordo com Cho *et al.* (15), com modificações. Resumidamente, 100µL do sangue total foi incubado com solução NBT a 5% (Sigma®), e estimulado com 5µL de 12-miristato-13-acetato de forbo (PMA, 300 ng/mL, Sigma®), por 30 minutos a 37°C. Após esse tempo, parou-se a reação por meio da adição de 2000 µL de EDTA (3mM) gelado, sendo as hemácias rompidas por lise osmótica. O NBT externo foi removido após lavagem com metanol (Synth®) e as células foram dissolvidas com KOH (Synth®, 3 M, 120 µL) e DMSO (Dimesol® - MarcoLab,99%, 140 µL). Posteriormente, a suspensão foi lida em espectrofotometria 620 nm em densidade óptica (OD). As amostras foram realizadas em duplicata, utilizando-se a média dos resultados para cada animal, com índice de intravariabilidade menor que 5%.

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística pelo programa estatístico GraphPad Instat. As variáveis do hemograma e do metabolismo oxidativo foram dados paramétricos, e para a interação tempo, utilizou-se ANOVA paramétrica para amostras repetidas e Tukey como pós teste. Para a interação tratamento utilizou-se o teste T paramétrico. As variáveis de peso foram amostras não paramétricas, e para a interação tempo utilizou-se ANOVA não paramétrica para amostras repetidas e Dunn como pós teste. Para a interação tratamento utilizou-se o teste T não paramétrico. Foi considerado significativo quando valor de $P \leq 0,05$ e tendência a significativo quando $P \leq 0,1$.

RESULTADOS

A tabela 2 traz os resultados da análise do metabolismo oxidativo de neutrófilos dos bezerros utilizados no experimento, fazendo o comparativo entre a interação tempo (Px) e interação tratamento (Py).

Foi possível constatar que, tanto no grupo controle (P=0,26) como no grupo tratamento (P=0,29), não houve diferença estatística significativa em relação a interação tempo. Entre as interações tratamento, o metabolismo oxidativo neutrofílico do grupo tratamento foi numericamente maior que o grupo controle a partir do D15, embora em nenhum destes momentos tenha ocorrido diferença significativa. Apenas no D15 houve tendência a significância estatística (P=0,10) ao grupo tratamento ter aumento esta função neutrofílica em comparação ao grupo controle.

Tabela 2. Metabolismo oxidativo de neutrófilos sanguíneos de bezerros conforme a suplementação ou não com probiótico.

Metabolismo oxidativo		D0	D15	D30	D45	Px
D.O.						
Controle	Media	1,13aA	1,06 aA	1,08 aA	0,92aA	0,26
	EPM	0,08	0,08	0,05	0,11	
Tratamento	Media	1,00aA	1,26aA	1,13aA	1,05aA	0,29
	EPM	0,05	1,34	1,14	1,01	
PY		0,20	0,10	0,30	0,260	

D.O.- densidade ótica, EPM erro padrão da média, Px interação tempo, Py interação tratamento. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, P<0,05.

Os valores do hemograma estão apresentados na tabela 3, avaliando-se a interação tempo (Px) e interação tratamento (Py).

Observa-se que os valores de hemácias em ambos os grupos aumentaram após o D0 na interação tempo (hemácias GC P=0,04; GT P=0,0001) e os valores de hemoglobina e hematócrito foram maiores na interação tratamento no D45 (P=0,03 e P=0,05 respectivamente). Os valores de leucócitos e suas populações não sofreram influência do tratamento nem tempo, notando-se apenas que houve uma tendência a diferença estatística dos monócitos a diminuírem sua contagem no D45, para o grupo controle (p=0,07).

A tabela 4 apresenta as médias referentes ao peso dos bezerros, em relação aos animais do grupo controle e grupo tratamento, fazendo o comparativo entre a interação tempo (Px) e interação tratamento (Py).

Considerando esses resultados, nota-se que os animais tinham o peso inicial e final sem diferença estatística entre os grupos, mas numericamente, o peso inicial do grupo tratado era menor que o grupo controle e o peso final, tornou-se maior. Além disso notou-se que no intervalo entre os dias, o grupo tratado apresentou tendência a ganhar mais peso que o controle no período entre D15 a D30 (P=0,08) e ganhou estatisticamente mais peso, no período D0 a D45 (P=0,05).

Tabela 3. Hemograma de bezerros conforme a suplementação ou não com probiótico.

Variáveis			D0	D15	D30	D45	Px
Hemácias x10 ⁶ /mm ³	Controle	Média	5,96aA	7,50bA	7,92bA	7,11abB	0,04
		EPM	0,41	1,08	0,58	0,33	
	Tratado	Média	6,05aA	7,20bA	7,72bA	7,74bA	0,0001
		EPM	0,26	0,35	0,39	0,40	
	Py		0,86	0,76	0,77	0,30	
	Hemoglobina g/dL	Controle	Média	9,07aA	8,32aA	8,72aA	7,87aA
EPM			0,85	0,69	0,63	0,41	
Tratado		Média	9,58aA	9,20aA	9,60aA	9,71aB	0,11
		EPM	0,42	0,52	0,56	0,49	
Py			0,57	0,33	0,34	0,03	
Hematócrito %		Controle	Média	25,16Aa	27,25aA	25,86aA	24,67aA
	EPM		1,37	2,56	1,34	1,86	
	Tratado	Média	25,32aA	27,80bA	27,31cA	29,91cB	0,0001
		EPM	0,77	1,02	0,96	0,70	
	Py		0,91	0,34	0,4	0,05	
	Leucócitos x10 ³ cél/μl	Controle	Média	10,46aA	10,31aA	10,57aA	9,06aA
EPM			3,525	3,98	2,86	2,32	
Tratado		Média	12,14aA	9,86aA	9,15aA	10,64aA	0,36
		EPM	1,56	2,58	5,67	3,57	
Py			0,47	0,71	0,63	0,32	
Neutrófilos x10 ³ cél/μl		Controle	Média	1,28aA	2,47aA	2,14aA	1,49aA
	EPM		0,56	2,31	1,49	1,12	
	Tratado	Média	1,58aA	1,85aA	1,29aA	1,50aA	0,70
		EPM	0,38	0,82	0,86	1,32	
	Py		0,55	0,70	0,31	0,90	
	Linfócitos x10 ³ cél/μl	Controle	Média	7,81aA	6,34aA	7,00aA	6,99aA
EPM			2,33	1,39	0,89	1,15	
Tratado		Média	9,27aA	6,89aA	6,50aA	8,03aA	0,12
		EPM	1,16	1,76	4,08	1,91	
Py			0,32	0,29	0,80	0,26	
Basófilos x10 ³ cél/μl		Controle	Média	0,04aA	0,07aA	0,00aA	0,03aA
	EPM		0,07	0,12	0,00	0,04	
	Tratado	Média	0,08aA	0,03aA	0,02aA	0,00aA	0,41
		EPM	0,13	0,04	0,04	0,00	
	Py		0,70	0,46	0,50	0,81	
	Eosinófilos x10 ³ cél/μl	Controle	Média	0,12aA	0,21aA	0,28aA	0,12aA
EPM			0,12	0,35	0,21	0,17	
Tratado		Média	0,49aA	0,25aA	0,36aA	0,35aA	0,60
		EPM	0,50	0,22	0,41	0,56	
Py			0,16	0,99	0,86	0,45	
Monócitos x10 ³ cél/μl		Controle	Média	1,21aA	1,20aA	1,14aA	0,42aA
	EPM		0,89	0,76	0,56	0,31	
	Tratado	Média	1,05aA	0,84aA	0,97aA	0,75aA	0,65
		EPM	0,07	0,38	0,58	0,76	
	Py		0,44	0,53	0,44	0,44	

EPM erro padrão da média, Px interação tempo, Py interação tratamento. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, P<0,05.

Tabela 4. Medias dos intervalos dos pesos dos bezerros conforme a suplementação ao não de probiótico.

	Peso (Kg)	Ganho de peso no período (kg)				Peso corporal (kg)	
		D0-D15	D15-D30	D30- D45	D0 a D45	Peso inicial	Peso final
Controle	media	4,6aA	5,80aA	5,80aA	14,80aA	119,60A	133,75A
	EPM	2,82	2,395	1,74	3,38	20,26	29,89
Tratado	media	7,0aA	10,00aA	7,40aA	24,20aB	110,75A	154,00A
	EPM	1,34	1,51	2,06	3,60	20,88	28,0
	Py	0,23	0,08	0,25	0,05	0,38	0,28

Px interação tempo, Py interação tratamento. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, P<0,05.

DISCUSSÃO

A partir dos resultados foi possível notar que o fornecimento do probiótico a base de *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* interferiu positivamente no ganho de peso dos animais, e interferiu pouco na imunidade inata.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos que conseguiram ultrapassar as barreiras físicas do organismo. Ao ser deflagrada, os fagócitos (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) englobam os patógenos, desencadeando um evento conhecido por metabolismo oxidativo, ou explosão respiratória, na qual há a ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase (NADPH) intracelular, que ao transferir elétrons para o citosol, forma espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, dos quais derivam outros metabólitos oxidantes, direcionados para a eliminação de patógenos internalizados (16). Desta maneira, animais com maior metabolismo oxidativo estariam com maior eficiência na eliminação de patógenos, e, portanto, com uma menor susceptibilidade a doenças infecciosas, particularmente as doenças bacterianas (17,18).

No presente estudo, verificou-se que, embora a suplementação de bezerros com probiótico a base de *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* não teve efeitos significativo sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, nenhum animal ficou doente durante o período experimental, indicando que não havia imunossupressão nos animais alimentados principalmente com silagem de milho tanto no grupo controle como no grupo suplementado.

Enquanto Qadis *et al.* (10), encontram que probióticos a base *L. plantarum*, *E. faecium* e *C. Butyricum* aumentaram a produção de citocinas inflamatórias e as subpopulações de leucócitos T, B e macrófagos de sangue periférico, em bezerros lactantes saudáveis ou com diarreia, e Fomenky *et al.* (11), encontraram que o probiótico a base de *Saccharomyces cerevisiae* aumentou a imunidade inata e suas funções de fagocitose e metabolismo oxidativo em bezerros durante o período de desmame. Porém Roodposhti e Dabiri (12), verificaram que probióticos com associação de bactérias (sete espécies) e fungos (duas espécies) ou prebióticos contendo fragmentos de *S. cerevisiae* melhoraram apenas o ganho de peso diário e reduziram a eliminação fecal de *E. coli* patogênica, mas não interferiram na imunidade de bezerras lactantes.

Possivelmente, essas diferenças podem ter ocorrido devido ao desafio imunológico diferente de cada estudo. Enquanto Qadis *et al.* (10) utilizaram sucedâneo lácteo em bezerros sadios e diarreicos, Fomenky *et al.* (12) estudaram bezerros alimentados com sucedâneo lácteo durante no período de desmame. Ambos estudos com maior desafio imunológico frente a uma dieta nutricionalmente mais fraca. Já Roodposhti e Dabiri (12) estudaram bezerros sadios sem

estresse imunológico, alimentados com leite integral. O presente estudo, avaliou bezerros saudáveis em fase de crescimento, com alimentação a base de forragem ensilada, o que possivelmente não representou um desafio imunológico expressivo a ponto de reduzir expressivamente as defesas neutrofílicas.

Reforçando o fato que a alimentação a base de silagem não interferiu na eficiência neutrofílica de eliminar patógenos, notou-se a estabilidade dos valores absolutos dos leucócitos sanguíneos e suas populações. Similarmente, Roodposhti e Dabiri (12) também não encontraram diferença significativa no leucograma de bezerras recém-nascidas alimentadas com leite integral e suplementadas com probióticos, prebióticos e ambos (simbióticos). No estudo conduzido por Peixoto *et al.* (19), os autores constataram que, em bezerros jovens saudáveis, os neutrófilos apresentaram menor eficiência no teste de redução do NBT, e aumento neutrofílico sanguíneo, devido a uma resposta compensatória.

Em relação ao eritrograma, notou-se que hemácias, hemoglobina e hematócrito estavam no limite inferior no D0, embora ainda dentro da normalidade fisiológica para a espécie (hemácias: 5-10⁶/μL; hemoglobina: 8-15g/dL; hematócrito: 24-46%) (20). Nos próximos momentos, observou-se aumento no número de hemácias em ambos os grupos, provavelmente em resposta ao vermífugo utilizado antes do início do experimento. Parasitas hematófagos, como *Haemonchus spp.*, causam severos distúrbios nos bovinos. Devido ao consumo de sangue, os animais desenvolvem quadros de anemia e, quando em grande carga parasitária, podem levar a óbito (21).

Em relação ao tratamento, notou-se que o probiótico aumentou os valores de hemácias e hematócrito aos 45 dias pós início da suplementação. Da mesma forma, Salahuddin *et al.* (22) encontraram aumento gradual (P<0,05) nos valores de hemácias em camundongos suplementados com probióticos por 45 dias, enquanto Aldana *et al.* (23), observaram melhora no hematócrito (P<0,05) de 2 grupos de bezerros saudáveis, suplementados com diferentes proporções de probiótico. Os autores associam o maior hematócrito com o elevado nível de proteínas plasmáticas e ion Fe⁺ disponibilizados pelo probiótico, os quais correlacionam-se diretamente com a eritropoiese.

A pesagem dos animais permitiu verificar que a suplementação com probiótico influenciou no ganho de peso dos animais. Segundo Roodposhti e Dabiri (12), os probióticos colonizam o intestino grosso, beneficiando a multiplicação de bactérias benéficas e excluindo o surgimento de bactérias deletérias, melhorando a eficiência alimentar nessa fase inicial. Porém, após duas semanas de tratamento, perde-se o efeito de promoção de ganho de peso (24), similarmente ao que ocorreu no presente estudo. Entretanto, Riddell *et al.* (9), não constataram aumento de ganho de peso de bezerros suplementados com probiótico a base de *Bacillus*, chegando à conclusão que os efeitos benéficos desse suplemento sobre o ganho de peso seriam observados se os animais estivessem submetidos a um maior nível de estresse.

Spanhaak *et al.* (25), afirmam que a suplementação com probióticos é mais efetiva no ganho de peso de animais com estatus de saúde negativo. A partir disso, é possível dizer que as mudanças no manejo promovidos para a realização da pesquisa, como a alimentação principalmente com silagem de milho, a contenção e o fornecimento do farelo de milho e probiótico diretamente na boca, possam ter gerado estresse de pequena magnitude até a adaptação dos animais, cujos efeitos foram atenuados pelo uso do probiótico, que promoveu pequeno e pontual incremento na função neutrofílica sanguínea, incremento nos valores de hematócrito e hemoglobina, além de maior ganho de peso nas fases iniciais da administração do suplemento, o que não refletiu em maior ganho de peso ao final do estudo. Tais resultados permitem concluir que o uso de probiótico é importante para animais em fase de adaptação a trocas de dieta e de manejo, mesmo quando estes desafios são tênues.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o probiótico a base de *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* promoveu pequeno e pontual incremento na função neutrofílica sanguínea, incremento nos valores de hematócrito e hemoglobina, além de maior ganho de peso nas fases iniciais da administração do suplemento, mostrando-se ser benéfico para animais em fase de adaptação de trocas de dieta e de manejo, mesmo quando estes desafios são tênues.

REFERÊNCIAS

1. McDowell LR, Williams SN, Hidioglou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L, et al. Vitamin E supplementation for the ruminant. Anim Feed Sci Technol. 1996;60(3):273-96. doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(96\)00982-0](https://doi.org/10.1016/0377-8401(96)00982-0).
2. Carnagey KM, Huff-Lonergan EJ, Trenkle A, Wertz-Lutz A, Horst RL, Beitz DC. Use of 25-hydroxy vitamin D3 and vitamin E to improve tenderness of beef from longissimus dorsi of heifers. J Anim Sci. 2008;86(7):1649-57. doi: 10.2527/jas.2007-0502.
3. Baldin SR, Mille DD, Martins CL, Pereira ASC, Barducci RS, Arrigoti MB. Feedlot performance, carcass characteristics and meat quality of Nellore and Canchim bulls fed diets supplemented with vitamins D and E. Acta Sci. 2013;35(4):403-10. doi: <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v35i4.18801>.
4. Ferreira AFMSC, Costa JN, Peixoto AP, Brito OS, Cassetari ML, Neto AO. Suplementação com vitamina E e a ocorrência de mastites em vacas da raça Jersey. Rev Bras Saude Prod Anim. 2007;8(2):71-82.
5. Bertagnon HG, Silva EB, Conneglian MM, Neumann M, Esper GVZ, Bastos GP, et al. Ação imunomoduladora da vitamina E na imunidade sistêmica e da glândula mamária de bovinos leiteiros alimentados com silagem. Semin Cienc Agrar. 2014;35(2):857-66.
6. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Harvey RB, Genovese KJ, Kennedy CN, et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. Anim Health Res Rev. 2008;9(2):217-25. doi: 10.1017/S1466252308001540.
7. Emmanuel DGV, Jafari A, Beauchemin KA, Leedle JAZ, Ametaj BN. Feeding live cultures of *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* induces an inflammatory response in feedlot steers. J Anim Sci. 2007;85(1):233-9. doi: 10.2527/jas.2006-216.
8. Lesmeister KE, Heinrichs AJ, Gabler MT. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. J Dairy Sci. 2004;87(6):1832-9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73340-8.
9. Riddell JB, Gallegos AJ, Harmon DL, McLeod KR. Addition of a Bacillus based probiotic to the diet of preruminant calves: influence on growth, health, and blood parameters. Int J Appl Res Vet Med. 2010;8(1):78-85.

10. Qadis AQ, Goya S, Yatsu M, Kimura A, Ichijo T, Sato S. Immune-stimulatory effects of a bacteria-based probiotic on peripheral leukocyte subpopulations and cytokine mRNA expression levels in scouring Holstein calves. *J Vet Med Sci.* 2014;76(5):677-84. doi: 10.1292/jvms.13-0534.
11. Fomenky BE, Chiquette J, Lessard M, Bissonnette N, Talbot G, Chouinard YP, et al. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 and *Lactobacillus acidophilus* BT1386 influence innate immune response and serum levels of acute-phase proteins during weaning in Holstein calves. *Can J Anim Sci.* 2018;98(3):576-88. doi: <https://doi.org/10.1139/cjas-2017-0120>.
12. Roodposhti PM, Dabiri N. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2012;25(9):1255-61. doi: 10.5713/ajas.2011.11312.
13. Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AC, Barbosa AM, Dekker RFH, Silva MLC. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semin Cienc Agrar.* 2009;30(1):117-34.
14. Feitosa FLF. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. 3a ed. São Paulo: Roca; 2014.
15. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim CA. Quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 2006;27(1):31-44. doi: [doi: 10.1080/15321810500403722](https://doi.org/10.1080/15321810500403722).
16. Zinkl JG, Kabbur MG. Neutrophil function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press; 1997. p. 331-50.
17. Burgos RA, Conejeros I, Hidalgo MA, Werling D, Herмосill A. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;143(1-2):1-10. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.037.
18. Martins ER, Bertagnon HG, Batista CF, Gomes RC, Santos KR, Bellinazzi JB, et al. Influência da suplementação de vitaminas A, D e E na função imune de bezerros alimentados com dieta à base de feno capim tifton (*Cynodon* spp.). *Pesqui Vet Bras.* 2017;36(5):453-9.
19. Peixoto APC, Costa JN, Kohayagawa A, Takahira RK, Saito ME. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca: influência dos fatores etários. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2002;3(1):16-20.
20. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press; 1997.
21. Girão ES, Leal JA, Girão RN, Medeiros LP. *Verminose bovina*. Teresina: Embrapa Meio-Norte; 1999. p.30. (Documento 41).
22. Salahuddin M, Akter S, Akter H, Miah MA, Ahmad N. Effects of probiotics on haematology and biochemical parameters in mice. *Bangladesh Vet.* 2013;30(1):20-4. doi: <https://doi.org/10.3329/bvet.v30i1.16281>.

23. Aldana C, Cabra S, Ospina CA, Carvajal F, Rodríguez F. Effect of a probiotic compound in rumen development, diarrhea incidence and weight gain in young holstein calves. *Int J Agric Biosyst Eng.* 2009;3(9):489-92.
24. Timmerman HM, Mulder L, Everts H, Van Espen DC, Van der Wal E, Klaassen G, et al. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J Dairy Sci.* 2005;88(6):2154-65. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72891-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72891-5).
25. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52(12):899-907.

Recebido em: 16/07/2019

Aceito em: 19/09/2019