

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Fatima Fernandes Caldoncelli Leite

Avaliação das alterações histopatológicas pós desafio com *Escherichia coli* patotipo
STEC/ETEC em bezerros tratados por via oral com biopolímero imunomodulador

Juiz de Fora
2024

Fatima Fernandes Caldoncelli Leite

Avaliação das alterações histopatológicas pós desafio com Escherichia coli patotipo STEC/ETEC em bezerros tratados por via oral com biopolímero imunomodulador

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas Área de concentração: Genética e Biotecnologia

Orientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

Coorientador: Dr. Janildo Ludolf Reis Junior

Juiz de Fora
2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Leite, Fatima Fernandes Caldoncelli.

Avaliação das alterações histopatológicas pós desafio com Escherichia coli patotipo STEC/ETEC em bezerros tratados por via oral com biopolímero imunomodulador / Fatima Fernandes Caldoncelli Leite. -- 2024.

105 f. : il.

Orientador: Humberto de Mello Brandão

Coorientador: Janildo Ludolf Reis Junior

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. betaglucana. 2. E. coli. 3. diarreia. 4. histopatologia. 5. imunomodulação. I. Brandão , Humberto de Mello , orient. II. Junior , Janildo Ludolf Reis , coorient. III. Título.

Fatima Fernandes Caldoncelli Leite

Avaliação das alterações histopatológicas pós desafio com Escherichia coli patotipo STEC/EPEC em bezerros tratados por via oral com biopolímero imunomodulador

Dissertação
apresentada
ao Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 01 de abril de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Janildo Ludolf Reis Junior - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcos Ferrante

Universidade Federal de Lavras

Juiz de Fora, 27/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Humberto de Mello Brandão, Usuário Externo**, em 05/04/2024, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janildo Ludolf Reis Junior, Professor(a)**, em 10/04/2024, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Novaes Rocha, Professor(a)**, em 10/04/2024, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Ferrante, Usuário Externo**, em 08/05/2024, às 20:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1721536** e o código CRC **F3DE095B**.

Dedico ao sonhos e à coragem, e à alegria de realizá-los.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido e me dado força, persistência e coragem para chegar até aqui.

A minha família, Felipe, Cassiano e Estela por me compreenderem e me apoiarem nas minhas ausências.

A minha mãe, onde tudo começou com seu incentivo ao estudo, seu exemplo de trabalho, sua retidão e sobretudo exemplo de fé.

A todos os amigos que me ajudaram de tantas formas nesta caminhada. Não poderia citar nomes pois a lista é grande! Cada um que me ouviu, me apoiou, me entendeu, que riu e que esteve comigo neste tempo, de alguma forma me ajudou e eu agradeço a amizade de vocês.

A meu orientador Humberto de Mello Brandão pela amizade, pelos ensinamentos e compreensão.

A meu coorientador dr. Janildo Ludolf Reis pelos ensinamentos e apoio.

Ao dr. Robson Sfaciotti Barducci, Biorigin e a Embrapa que possibilitaram a execução deste projeto.

Ao dr Haroldo, Faculdade de Medicina Veterinária da UFJF, pela disponibilidade no desenvolvimento das atividades técnicas deste projeto.

RESUMO

Biopolímeros são moléculas que tem como fonte organismos vivos. As beta- glucanas são um grupo de biopolímeros que estão entre os principais componentes estruturais da parede celular dos fungos, leveduras, plantas e algumas bactérias, são chamadas modificadores de resposta biológica (BRM) e tem ação imunomoduladora. A susceptibilidade de bezerros no período de desmame à infecções coloca em risco a saúde do rebanho bem como a humana por se tornar um reservatório de agentes nocivos. O uso frequente de antibióticos leva a resistência antimicrobiana e ao difícil controle das infecções. A busca por novos produtos que possibilitem o menor uso de antibióticos traz benefícios e impactos econômico e ambiental positivos. Através deste estudo pretendeu-se avaliar a ação da beta-glucana sobre o sistema imunológico de bezerros, observando as alterações histopatológicas nos órgãos após infecção via oral pela *STEC/ETEC*. O experimento é um delineamento do tipo estudo clínico em paralelo com 6 repetições por tratamento e um grupo controle. Foram administrados aos grupos de bezerros lactentes quatro níveis de doses orais de beta-glucana durante 28 dias após os quais, os animais foram desafiados com *STEC/ETEC*. No quinto dia após a infecção experimental seis animais de cada tratamento foram sacrificados para coleta de tecidos para análises histológicas. Baseado nas alterações encontradas no trato gastrointestinal, pode-se afirmar que a administração diária 12 mg/kg de peso vivo de beta-glucana para bezerros lactentes foi efetiva na redução da intensidade das lesões causadas por uma infecção induzida com 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC). O mecanismo pelo qual esse efeito ocorreu não foi avaliado. Todavia, baseado na literatura científica e nos achados de aumento da frequência microabscessos, atribui-se esse efeito ao estímulo do sistema imune. Por outro lado, animais que receberam doses diárias mais elevadas de beta-glucana (*i.e.* 36, 60 e 84 mg/kg de peso vivo) apresentaram intensidade das lesões causadas por uma infecção induzida com 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC) semelhantes ao grupo controle. Em comparação ao tratamento com grupo 1, o mecanismo pelo qual doses diárias maiores de beta-glucana resultam em redução na capacidade de resposta frente a desafio de *E. coli* não foi avaliado, contudo hipotetizar que a sobredosagem de beta-glucana gere uma resposta imune exacerbada, que em conjunto com a *E. coli* aumente as lesões teciduais; ou que a sobredosagem de beta-glucana induza a uma discreta imunossupressão dos animais dos grupos 2, 3 e 4 em relação aos

animais do grupo 1, igualando a capacidade de resposta dos grupos 2, 3 e 4 ao grupo controle. Estudos futuros à luz de técnicas apuradas de análises biológicas da produção e expressão gênica de citocinas e receptores da resposta imunológica como TLR4, conjuntamente com dados clínicos e morfológicos poderão explicar e confirmar as hipóteses aqui tratadas.

Palavras-chaves: beta glucana, imunomodulação, diarreia, *Escherichia coli*, histopatologia

ABSTRACT

Biopolymers are molecules that come from living organisms. Beta-glucans are a group of biopolymers that are among the main structural components of the cell walls of fungi, yeast, plants and some bacteria. They are called biological response modifiers (BRM) and have an immunomodulatory action. The susceptibility of calves during the weaning period to infections puts the herd's health as well as human health at risk by becoming a reservoir of harmful agents. The frequent use of antibiotics leads to antimicrobial resistance and difficult infection control. The search for new products that allow for less use of antibiotics brings benefits and positive economic and environmental impacts. This study aimed to evaluate the action of beta-glucan on the immune system of calves, observing histopathological changes in the organs after oral infection by STEC/EPEC. The experiment is a parallel clinical study design with 6 replications per treatment and a control group. Groups of suckling calves were administered four oral dose levels of beta-glucan for 28 days after which the animals were challenged with STEC/EPEC. On the fifth day after experimental infection, six animals from each treatment were sacrificed to collect tissues for histological analysis. Based on the changes found in the gastrointestinal tract, it can be stated that the daily administration of 12 mg/kg of live weight of beta-glucan to suckling calves was effective in reducing the intensity of lesions caused by an infection induced with 10^{10} CFU of E. coli (STEC/EPEC). The mechanism by which this effect occurred has not been evaluated. However, based on scientific literature and findings of increased frequency of microabscesses, this effect is attributed to stimulation of the immune system. On the other hand, animals that received higher daily doses of beta-glucan (i.e. 36, 60 and 84 mg/kg of body weight) showed intensity of the lesions caused by an infection induced with 10^{10} CFU of E. coli (STEC/EPEC) similar to the control group. In comparison to treatment with group 1, the mechanism by which higher daily doses of beta-glucan result in a reduction in the capacity to respond to E. coli challenge has not been evaluated, however it is hypothesized that beta-glucan overdose generates an exacerbated immune response, which in together with E. coli increases tissue damage; or that the beta-glucan overdose induces a slight immunosuppression of the animals in groups 2, 3 and 4 in relation to the animals in group 1, equaling the response capacity of groups 2, 3 and 4 to the control group. Future studies using refined techniques

for biological analysis of the production and gene expression of cytokines and immune response receptors such as TLR4, together with clinical and morphological data, will be able to explain and confirm the hypotheses discussed here.

Keywords: beta glucan, immunomodulation, diarrhea, Escherichia coli, histopathology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	AS BETA-GLUCANAS.....	12
1.1.1	Atividade biológica no sistema imune.....	14
1.1.2	Atividade hipoglicemiante.....	17
1.1.3	Atividade antitumoral.....	18
1.1.4	Aplicações biotecnológicas.....	19
1.1.5	Perspectivas de uso da beta-glucana na bovinocultura.....	20
1.2	<i>E. COLI</i> STEC/ETEC.....	21
1.3	RESPOSTA IMUNE FRENTE A INFECÇÃO DE <i>E. COLI</i>	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	METODOLOGIA.....	29
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.2	NECROPSIA.....	30
3.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	30
3.4	COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA.....	31
3.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	32
3.6	ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INTESTINAIS.....	45
4.2	ALTERAÇÕES EM ÓRGÃOS HEMATOLINFÓIDES	75
5	CONCLUSÃO.....	85

5.1	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXOS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros são moléculas estruturadas em cadeias lineares, ramificadas ou entrecruzadas e que tem como fonte organismos vivos. Os biopolímeros são obtidos a partir de fontes naturais, podendo ser extraídos quimicamente a partir de um material biológico ou sintetizados por organismos como plantas, animais, bactérias e leveduras. Os biopolímeros podem ser classificados quanto ao seu potencial biodegradável, quanto ao seu comportamento térmico, quanto a sua capacidade de se misturar com outras moléculas e sua composição (George et al., 2020). A utilização destas características dos biopolímeros e a combinação delas a partir da mistura de biopolímeros com outros biopolímeros ou com nanopartículas possibilita a criação de uma infinidade de compósitos com diferentes propriedades que servirão às necessidades da evolução da ciência e tecnologia.

Biopolímeros comerciais mais comuns quimicamente extraídos de seres vivos são moléculas de poliésteres de ácidos α -hidroxialcanóicos como ácidos láctico, glicólico, málico, tartálico, benzílico e suas misturas. Os polihidroxialcanoatos (PHA) são sintetizados por bactérias (Urtuvia et al., 2014) e possuem um amplo potencial de utilização como bioplásticos biodegradáveis em diversas áreas como na agricultura (Amelia et al., 2019) e na bioengenharia de tecidos (Chen et al., 2005). Policarbonatos alifáticos são utilizados na engenharia de scaffolds e como drug delivery. Poliamidos são proteínas naturalmente disponíveis e são utilizados na fabricação de fibras e filmes devido às suas características de flexibilidade, durabilidade e força. Nylon são bons exemplos de poliamidos com ampla utilização na fabricação de roupas e plásticos, bem como para fabricação de dispositivos médicos por serem biocompatíveis. Poliuretanos tem sua utilização como biopolímeros na engenharia médica em scaffolds, implantes e enxertos devido a sua estabilidade, resistência, flexibilidade e superfícies com propriedades biofuncionais (George et al., 2020).

Biopolímeros naturais são naturalmente produzidos por seres vivos, incluindo celulose, amido, carboidratos, gelatina, colágeno, agar, quitina, quitosan, etc. Por exemplo, o polímero polilactídeo é obtido do açúcar do leite, da batata, do trigo e pode ser utilizado em implantes cirúrgicos. O amido pode ser extraído da batata, milho, trigo e tapioca e por sua propriedade termoplástica pode ser fundido e utilizado para moldagem, injeção e extrusão (Jha et al., 2019). A celulose é o biopolímero mais

abundante no mundo e tem sido utilizada no campo da medicina para administração controlada de medicamentos, cicatrização de feridas e crescimento celular. Recentemente um filme 3D de nanocelulose foi utilizado como veículo para uma droga anticâncer demonstrado ser capaz de liberar a droga de forma controlada (Mohan et al., 2020). O avanço na utilização de biopolímeros possibilitará usar uma menor quantidade de medicamentos, com menores custos, efeitos colaterais locais e sistêmicos. Adicionalmente, um scaffold de um composto contendo celulose demonstrou melhorar a proliferação celular aplicando-se um curativo em ferida de pé diabético com resolução completa da lesão (Kanjou et al., 2019). Ainda possui aplicações na engenharia elétrica demonstrando melhorar a condutividade, na indústria têxtil e no setor de modas na fabricação de produtos customizados, na indústria alimentícia e farmacêutica por demonstrar excelente barreira ao oxigênio (Mohan et al., 2020).

Matérias primas de origem animal também têm sido utilizadas para produção de biopolímeros com diversas propriedades. Polímeros de queratina podem ser extraídos de penas e patas de aves, colágeno pode ser obtido de pele de peixes de água doce ou salgada e quitosana de exoesqueleto de crustáceos (Arotoma et al., 2020). Os biopolímeros têm ampla utilização na agricultura, na medicina, na indústria farmacêutica, química e engenharia além de reunir qualidades de disponibilidade na natureza, proceder de fontes renováveis e ser biocompatíveis e biodegradáveis. Estas características dos biopolímeros coloca-os em sintonia com a preservação ambiental e com a qualidade de vida que queremos para o nosso planeta.

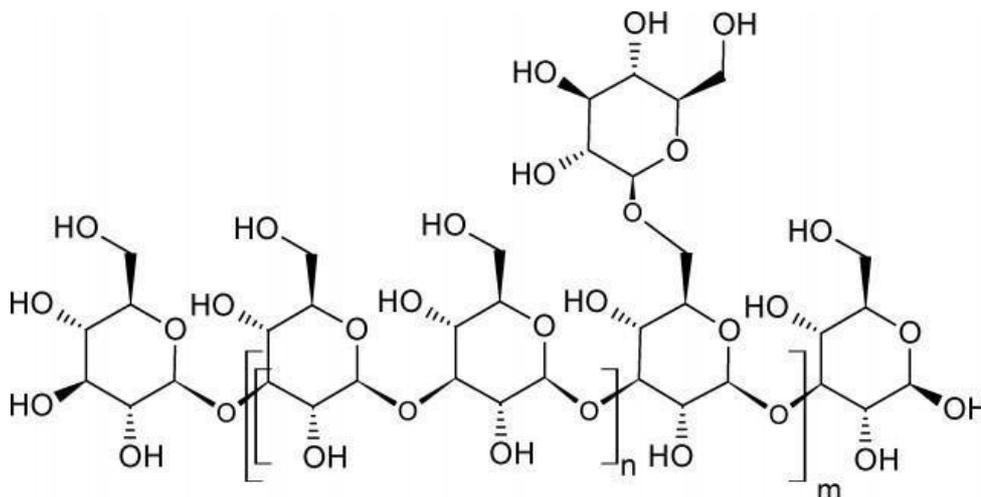
Estudos em bovinos têm demonstrado alta taxa de morbidade e mortalidade por infecções por diversos micro-organismos, muitas vezes com infecções mistas em que a *E coli* está presente em 50% delas (Dall Agnol et al., 2021). Animais sadios são o principal reservatório de *E coli* que é transmitida via fecal-oral nas primeiras semanas de vida e causa doença diarreica grave e morte (ACRES, 1985). O uso de antibióticos é o principal meio de tratamento dessa infecção. A resistência bacteriana ao tratamento, a eliminação de bactérias não patogênicas e o alto custo trazem dificuldades e limitações ao seu uso. Medidas de melhoramento no manejo destes animais para proteção contra infecções são necessárias, porém estratégias que potencializem a imunidade inata poderão contribuir para o seu melhor desempenho frente às infecções. Alguns produtos naturais possuem propriedades anti-

inflamatórias (Xiong et al., 2020), antimicrobianas e imunomoduladora (Guan et al., 2019). O biopolímero beta-glucana é reconhecido como um imunomodulador por seus efeitos sobre a defesa imunológica contra micro-organismos (Novak et al., 2008).

1.1 AS BETA-GLUCANAS

As beta-glucanas são um grupo de biopolímeros que estão entre os principais componentes estruturais da parede celular dos fungos, leveduras, plantas e algumas bactérias (Saetang et al., 2022; Sonck et al., 2010). As beta-glucanas são homopolímeros de glicose, polissacarídeos, organizados em uma molécula linear com ligações (1→3)-β-D-glicosídicas onde o carbono 1 da molécula de glicose liga-se ao carbono 3 da próxima molécula de glicose. As beta-glucanas são uma família com variadas conformações em sua estrutura. Podendo ser desde moléculas de cadeia simples linear até moléculas complexas de tripla hélice com variadas ligações de cadeias laterais (Magnani et al., 2008). A beta-glucana isolada da parede do *Saccharomyces cerevisiae* possui ramificações de cadeias laterais com ligações (1→6)-β-D-glicosídicas onde o carbono 1 liga-se ao carbono 6 da próxima molécula da cadeia lateral (Figura 1) (Novak et al., 2008).

Figura 1- Estrutura da beta-glucana com ligações (1→3)-β-D-glicosídicas e uma ramificação com cadeia lateral com ligação (1→6)-β-D-glicosídicas.



Fonte: NOVAK et al (2008).

Quanto a solubilidade as beta-glucanas podem ser solúveis ou insolúveis em álcali ou em água. Na parede do *S. cerevisiae* beta-glucana possui uma fração insolúvel com poucas ramificações do tipo (1-6) e outra solúvel com muitas destas ramificações (Manners et al., 1973). Segundo Lee et al., 2001 a solubilidade em água depende do número de ramificações e de sua conformação estrutural. A extração da beta-glucana pura, ou seja livre de proteínas e outros constituintes da parede do *S. cerevisiae* resultou em uma beta-glucana solúvel em água e mais eficiente na estimulação de macrófagos que as beta-glucanas não purificadas. Devido à sua solubilidade em água pode ser utilizada via venosa. Vários métodos de obtenção das beta-glucanas influenciam diretamente na sua estrutura final e por consequência na sua solubilidade e atividade biológica (Bohn et al., 1995; Magnani et al., 2008).

Após a administração oral, as beta-glucanas chegam ao intestino delgado onde são fagocitadas pelas células epiteliais M (pinocytic microfold cells) que tem capacidade fagocítica e transportam a beta-glucana através do epitélio e entregam-na para os macrófagos presentes na placa de Peyer. Estes macrófagos migram para o sistema linfático entregando beta-glucana para medula óssea, baço e linfonodos. Na medula óssea, os macrófagos clivam a beta-glucana em fragmentos ativos de 25- kDa que ativam os neutrófilos através da ligação ao receptor CR3 e modula os progenitores mielóides hematopoiéticos. Nos linfonodos, a beta-glucana ativa as células dendríticas que ativam células T CD4 e CD8+ específicas. Adicionalmente as beta-glucanas podem induzir citotoxicidade celular dependente do receptor CR3 na presença de células tumorais iC3b-opsonizados (Vetvicka et al., 1996).

As beta-glucanas fazem parte de um grupo de moléculas chamadas modificadores de resposta biológica (BRM) que são divididas em citocinas e imunomoduladoras. A beta-glucana, imunomoduladora proveniente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), possui uma estrutura central formada por unidades com ligações (1-3)- β -D-glucopiranosil e ramificações do tipo beta(1-6)- β -D-glicosídicas de diferentes tamanhos (Manners et al., 1973), o que lhe confere diferentes atividades biológicas (Sonck et al., 2010). As beta-glucanas podem ser solúveis ou insolúveis e suas propriedades biológicas são dependentes da fonte e do método de extração. As beta-glucanas solúveis possuem atividade antitumoral

enquanto que as beta- glucanas insolúveis possuem maior atividade imunoestimulatória e podem ser administradas oralmente (Vannucci et al., 2013).

1.1.1 Atividade biológica no sistema imune

Do ponto de vista imunológico, estes polímeros apresentam grande potencial como imunomoduladores, uma vez que são reconhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do sistema imune inato dos mamíferos, em especial aqueles que possuem ramificações do tipo beta (1- 6). Seu principal receptor é a Dectin-1, todavia outros receptores também foram relacionados ao seu reconhecimento, como o receptor de complemento 3 (CR3), receptor toll-like 2 (TLR2) e o lactosilceramida 2 e 6 (Sonck et al., 2010). A Dectina-1 foi descoberta por Ariizumi et al, 2000 em células dendríticas e descrita por Gordon D. Brown e Siamon Gordon em 2001 como um receptor para beta- glucana em macrófagos, sendo detectada também em monócitos, células NK, além de células não imunes como células de Langerhans, baço, timo, fígado, células endoteliais, fibroblastos e epitélio alveolar. O gene que codifica a Dectina-1 encontra-se no cromossomo 12 (Brown, 2006). A Dectina-1 possui dois domínios de ligação para células T e outro para carboidratos beta-glucanas com ligações beta(1-3) e beta(1-6) (Ariizumi et al., 2000; Brown, 2006; Gordon, 2001). Demonstrou-se também que macrófagos são capazes de fagocitar conídias de *Candida Albicans* sem opsonização através da ligação da beta- glucana presente na parede do fungo com o receptor Dectina-1 (Brown; Gordon, 2001). A Dectina-1 é um receptor de reconhecimento de padrões (PRR) non-Toll-like (non-TLR PRR), ou seja reconhece diretamente um antígeno sem a necessidade de opsonização ou indiretamente, porém sem a necessidade de rearranjo mutacional para produção de receptores antigênicos específicos. Sendo assim participa diretamente da resposta imune inata no reconhecimento de PAMPs que tem na beta-glucana um dos seus principais representantes (Brown, 2006). A Dectina reconhece especificamente a beta- glucana solúvel e também particulada através da ligação aos dois resíduos Trp221 e His223 existentes em sua parte externa da molécula (Adachi et al., 2004). Após o reconhecimento, ocorre a fagocitose e eliminação do patógeno cujos processos mediados por estes receptores não são bem conhecidos. Porém sabe-se que os PRRs, dentre eles a Dectina-1, são capazes de induzir a resposta imune. Adicionalmente, a Dectina-1 possui em sua porção intracitoplasmática um immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAM)-like que

está envolvido na ativação celular (Brown et al., 2003). Estudos demonstraram que a Dectina-1 pode ligar-se a linfócitos T CD4 e CD8 bem como participar do mecanismo de apresentação de antígenos das células dendríticas e macrófagos. Ainda induz a produção de várias citocinas e quimiocinas como TNF, CXCL2 (quimiocina ligante 2), IL-2, IL-10 and IL-12 e induz o estresse respiratório. Para estimular a produção de IL-12, TNF e possivelmente IL-2 há a interação da Dectina-1 com TLR2 e TLR6 (Brown et al., 2006).

Através do estudo das consequências da ativação da Dectina-1 pode-se conhecer os efeitos das beta-glucanas na resposta imune. Assim, as beta-glucanas estimulam tanto a fagocitose de forma inespecífica quanto a produção de citocinas pró-inflamatórias por células fagocitárias como componentes do complemento, IL-1 α/β , TNF- α , IL-2, IFN- γ e eicosanóides, bem como IL-10 e IL-4 (Vannucci et al., 2013). Foi também descrito um efeito protetor de β -glucana contra o estresse oxidativo (SENER et al., 2005). Adicionalmente, têm a habilidade de estimular neutrófilos e monócitos a produzirem espécies reativas de oxigênio, melhorando inespecificamente a resposta imunitária (Rubin-Bejerano et al., 2007). Todavia, a intensidade de estímulos nos diferentes receptores supracitados parece ser dependente espécie fonte da beta-glucana (Rubin-Bejerano et al., 2007; Vetvicka, 2015).

Especificamente quando as beta-glucanas são administradas oralmente, o efeito protetivo de mucosa ocorre via estimulação da placa de Peyer e de linfócitos intraepiteliais que, aparentemente, são ativados via interação com receptores de superfície das células M (Volman et al., 2008). De uma forma geral, a potência imunológica das beta-glucanas está associada à sua habilidade em ativar os leucócitos (Sandvik et al., 2007) e é dependente de sua massa molecular, conformação, solubilidade e do grau e posicionamento/densidade de ramificações. Assim, tem-se grande diferença na capacidade estimulatória entre as beta-glucanas de diferentes fontes e solubilidades (Sonck et al., 2010). Em geral, tem-se sugerido que as beta-glucanas de grande peso molecular podem ativar diretamente os leucócitos, estimulando suas funções fagocítica, citotóxica e antimicrobiana. Já as beta-glucanas de peso molecular intermediário também possuem atividade biológica in vivo, mas seus efeitos celulares são menos evidentes. Por sua vez, os de baixo peso molecular são geralmente considerados de pouca atividade (Akramienė et al., 2007). Revisões de literatura demonstram que as beta-glucanas apresentam capacidade de

treinar e modular a resposta imune de camundongos, ratos, primatas, suínos, cães, aves, peixes (Bashir et al., 2017; Goodridge et al., 2009; Rodrigues et al., 2020) e bovinos (Burdick et al., 2021). Por esta razão, este biopolímero é amplamente utilizado para mitigar o impacto de patógenos em animais expostos à períodos de estresse como, por exemplo, a fase de desmame de leitões (Burdick et al., 2021).

Em trabalho conduzidos com murinos demonstrou-se que a coadministração de glutamina e beta-glucana de *S. cerevisiae* à ratos desafiados com citarabina, promoveu melhoria da resposta imune, redução do processo inflamatório e incremento do trofismo intestinal, quando comparado com os demais tratamentos (Porsani et al., 2017). Suínos tratados com beta-glucana apresentaram maior atividade do sistema imune inato e, assim, melhorias em respostas protetoras contra infecções, demonstrando também que esses compostos são capazes de ativar monócitos, macrófagos e células Natural Killers (NK) (Stuyven et al., 2009). Indiretamente, ressalta-se que também pode haver a estimulação de linfócitos T e B via citocinas na espécie (Vetvicka, 2015).

Em bovinos, o potencial das beta-glucana para promover melhorias na resposta imune foi demonstrado pela coadministração de 600 mg de beta-glucana com antígenos de *Neospora caninum* em vacas, o que promoveu uma expressiva resposta de anticorpos (Mansilla et al., 2015). Com esta espécie, Cole e colaboradores conduziram dois experimentos avaliando o efeito do fornecimento de *S. cerevisiae* como beta-glucana na saúde animal. No primeiro experimento, os autores realizaram infecção experimental com vírus da IBR pela via nasal em 30 animais, divididos em grupo controle e dieta contendo 0.75% de *S. cerevisiae* como beta-glucana. Nesse experimento, os animais tratados apresentaram tempo de recuperação menores e sinais clínicos menos intensos que o grupo controle (Cole et al., 1992). No segundo, os autores acompanharam a performance zootécnica de 101 bezerros naturalmente expostos ao vírus causador de IBR recebendo dietas contendo 0, 0.75, 1.125 ou 1.5% de *S. cerevisiae*. Nesse experimento, apesar de não ter sido detectada diferença entre tratamentos nos parâmetros zootécnicos, o grupo que recebeu maiores doses de beta-glucana apresentou taxa de morbidade inferior, recuperação clínica mais rápida que os demais tratamentos, corroborando com os achados de infecção experimental. Magalhães e colaboradores também avaliaram o uso de *S. cerevisiae* como fonte de beta-glucana e seu efeito nos parâmetros produtivos, de saúde e imunológicos de 512

bezerros em dois tratamentos, um controle e outro recebendo dietas 2% de *S. cerevisiae*. Nesse experimento não foram observadas diferenças entre os tratamentos nos parâmetros IgG total e capacidade fagocitária contra *E. coli* (Magalhães et al., 2008). Cabe destacar que, em ambos os artigos, os autores não relataram o valor nominal de beta- glucana administrado aos animais, o que é um grande limitante de reprodutibilidade pois a capacidade de produção de beta-glucana pelo *S. cerevisiae* é fortemente influenciada tanto pela estirpe utilizada quanto pelas condições de cultivo da levedura. Por outro lado, Wójcik (2014), identificou um robusto aumento da atividade proliferativa, fagocitária e de produção de espécies reativas de oxigênio de fagócitos isolados em sangue periférico de bezerros que receberam oralmente beta-glucana extraídas de *S. cerevisiae* na dose 50 mg/kg de peso vivo, quando comparado ao grupo controle. Por sua vez, Gimenes e colaboradores, também utilizando beta- glucana extraída de *S. cerevisiae* na dose estimada de 11 mg/kg de peso vivo (V.O.), não identificaram incremento na capacidade fagocitária de neutrófilos em relação ao grupo controle (Gimenes et al., 2020). Estudos padronizados com quantidades definidas de beta-glucanas, bem como sua conformação e peso molecular precisam ser realizados para que possamos conhecer melhor a ação destes biopolímeros sobre o sistema imunológico.

1.1.2 Atividade hipoglicemiante

Estudos sobre os efeitos metabólicos das beta-glucanas tem demonstrado que estas são capazes de melhorar o controle glicêmico e colesterolêmico, os níveis de pressão arterial e a perda de peso. As beta-glucanas são fibras, que significa que não são digeridas ou absorvidas no intestino delgado humano, porém sofrem fermentação parcial ou completa no cólon (Bozbulut, et al., 2019). A solubilidade das beta- glucanas é influenciada pela sua estrutura (Havrlentova et al., 2011), sendo que Cadeias altamente polimerizadas de β -(1 \rightarrow 3) glucanas não são completamente solúveis em água, enquanto que as intensidades dessas ramificações determinam a solubilidade final da molécula. (Khoury et al., 2012). Segundo os autores, fibras solúveis são efetivas no controle da diabetes, obesidade, dislipidemia e hipertensão. Em adição, elas também promovem um retardo do esvaziamento gástrico e uma digestão e absorção mais lentas, com produção de ácidos graxos de cadeia curta no cólon devido à fermentação bacteriana. Tal condição leva a uma sensação de saciedade mais duradoura, diminuindo, assim, a glicemia pós-prandial e melhorando

da resposta à insulina. Dessa forma, as beta-glucanas são úteis na prevenção, tratamento e controle do diabetes, bem como de doenças cardiovasculares, obesidade e hiperlipidemia (Bozbulut, et al., 2019). Os efeitos de redução do colesterol das beta-glucanas da aveia foram demonstrados por Othman et al. (2011). Por sua vez, segundo os autores, a influência da beta-glucana na glicêmica depende da dose, duração do consumo, características físico-químicas da biomolécula, métodos de processamento e forma alimentar. De uma forma geral, a fermentabilidade e a elevação da viscosidade são as bases dos benefícios hipoglicêmicos das beta-glucanas (Bozbulut, et al., 2019). Em humanos, estimou-se que o consumo de mais de 3g de beta-glucanas em indivíduos diabéticos do tipo 2 por mais de 3 semanas promoveu redução da massa corporal (Liatis et al., 2009). Beck et al. (2009), relataram que a ingestão diária de 4-6g de beta-glucana aumenta o hormônio peptídeo YY (PYY), que tem um papel significativo na regulação do apetite e controle da obesidade.

1.1.3 Atividade antitumoral

Devido a suas propriedades imunomoduladoras as beta-glucanas tem sido exploradas quanto a sua ação no microambiente tumoral em tratamentos anticâncer, bem como, carreadora de substâncias que possam ativar a resposta imune e atuar como adjuvante a quimioterápicos e imunobiológicos. Vetvicka et al. (1996), concluíram que a ligação da beta-glucana ao receptor celular CR3 resulta em aumentada citotoxicidade contra células tumorais iC3b-opsonizadas, além de propiciar a fagocitose e degranulação de neutrófilos. Segundo estes autores, as beta-glucanas são capazes de ativar as células dendríticas, as quais fagocitam as células tumorais e ativam as células T CD4 e CD8+ específicas. Adicionalmente, este biopolímero pode induzir citotoxicidade celular dependente do receptor CR3 na presença de células tumorais iC3b-opsonizadas (Geller et al., 2019; Vetvicka et al., 1996).

Beta-glucanas administrados via oral, clivadas por macrófagos em fragmentos ativos de 25-kDa ligam-se ao receptor CR3 de neutrófilos e monócitos, ativando a cascata CR3-Syk-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) e promovendo atividade citotóxica destas células (Li et al., 2006). Por sua vez, nos linfonodos, a beta-glucana ativa as células dendríticas, que também fagocitam as células tumorais e contribuem para ativação das células T CD4 e CD8+ específicas. Em muitas situações, as células tumorais alteram a resposta imune e promovem um fenótipo de supressão ou tolerância imunológica que é importante para o crescimento tumoral e

desenvolvimento de metástases. A modulação da resposta imunológica mediada pela beta-glucana no microambiente tumoral para um perfil inflamatório tem um potencial promissor como terapia anticâncer (Vetvicka et al., 1996).

Segundo Wu e colaboradores (2014), a interação da beta-glucana com o receptor Dectina-1 é capaz de reprogramar as células dendríticas, as quais, via integrina $\alpha\beta 8$ e TGF α induzem linfócitos T CD8 $+$ a expressar CD103 (α integrina) que é um ligante da E-caderina. Tal condição faz com que estes linfócitos se acumulem no ambiente tumoral, aumentando a necrose e inibindo a progressão tumoral. Por suavez, a ligação da beta-glucana ao receptor Dectina-1 em macrófagos associados ao tumor (TAM) é capaz de induzir o fenótipo M1 de macrófago ativado, aumentando o potencial de apresentação de antígenos e de produção de citocinas da resposta TH1 como IFN- γ (Liu et al., 2016). Desta forma a beta-glucana tem se mostrado um interessante agente modulador da resposta imune antitumoral.

1.1.4 Aplicações biotecnológicas

Os estudos sobre a utilização da beta-glucana na indústria biotecnológica tem demonstrado que, em função de suas propriedades biológicas, este versátil biopolímero possui várias possibilidades de aplicações. Esta macromolécula já foi utilizada para produção de *scaffold*, onde, em conjunto com gelatina mostrou promover bom sustentáculo para crescimento de fibroblastos e ceratinócitos para produção de pele artificial, o qual apresentou resultados promissores na cicatrização de feridas em estudos *in vivo* (Lee et al., 2003). Quando utilizados em curativos no tratamento de queimaduras em crianças *scaffolds* produzidos a base de beta-glucana demonstraram bons resultados, facilitando tanto o cuidado para o paciente e familiares, quanto na promoção da diminuição da dor (Delatte et al., 2001). Um compósito de hidroxiapatita e beta-glucana foi utilizado para favorecer a regeneração óssea em áreas desse tecido, trouxe bons resultados de reconstituição óssea de um cão com ampla área de osteomielite maxilar (Belcarz et al., 2013). Estes achados demonstram o potencial de utilização da beta-glucana na recomposição de tecidos biológicos.

O uso da beta-glucana como adjuvante em vacinas contra COVID-19 demonstrou melhora nos parâmetros inflamatórios como d-dímero, ferritina, proteína C reativa e citocina IL6 (Pushkala et al., 2021, Raghavan et al., 2022). A beta-glucana também

tem um papel promissor se utilizada como um sistema de delivery de antígenos e drogas aos macrófagos (Cordeiro et al., 2021, Vetvicka et al., 2020). Cordeiro et al., 2021 produziram um nanocompósito de beta-glucana e quitosana e o utilizaram com carreador de antígeno ovalbumina injetado em subcutâneo de ratas. Os autores puderam observar o acúmulo do nanocompósito nas células dendríticas de linfonodos que drenam a área tecidual tratada, demonstrando sua habilidade em carrear antígenos para células apresentadoras de antígenos. Adicionalmente, verificaram que este nanocompósito foi capaz de promover a proliferação e ativação de células T, bem como de células B secretoras de anticorpos. Outra vantagem deste nanocompósito é ser uma formulação liofilizada termoestável, contribuindo para superação de limitações farmacotécnicas de conservação, no que tange os períodos de produção e distribuição de vacinas (Cordeiro et al., 2021). Devido a sua interação com o sistema imunológico, a utilização da beta-glucana como carreadora de antígeno ou como adjuvante na composição de vacinas é promissora.

A utilização de beta-glucana na indústria alimentícia tem boas perspectivas devido às suas diversas utilidades. Em uma revisão Zhu et al., 2015 relatou seu uso na formulação de alimentos pró-bióticos, como melhorador na aglutinação de formulações sem glúten, como redutor de ingestão calórica diária e dos níveis de colesterol, como facilitador da proteólise e liberação de aminoácidos da dieta e melhorar a resposta glicêmica a alimentos industrializados (Zhu et al., 2015). A adição de beta-glucana na dieta poderá contribuir para uma alimentação com melhor aproveitamento dos nutrientes e com mais saúde.

1.1.5 Perspectivas de uso da beta-glucana na bovinocultura

De uma forma geral, suplementação alimentar de bezerros com beta-glucana tem demonstrado potencial para estimular o sistema imune (Wójcik et al., 2014). Em estudo com a administração de leveduras hidrolisadas, Kim e colaboradores (2011) demonstraram melhora da saúde e do sistema imune de bezerros desafiados com vacina de micro-organismos vivos. Por sua vez, a suplementação dietética com cultura de *Saccharomyces cerevisiae* melhorou o aspecto das fezes e reduziu o tempo de fezes aquosas, a incidência de febre, a intensidade de diarreia e a taxa de mortalidade em bezerros (Magalhães et al., 2008). Wójcik (2014) identificou robusto aumento da atividade proliferativa, fagocitária e de produção de espécies reativas de oxigênio de fagócitos isolados em sangue periférico de bezerros que receberam

oralmente beta-glucana extraídas de *S. cerevisiae* na dose 50 mg/kg de peso vivo, quando comparado ao grupo controle. Por sua vez, Gimenes e colaboradores (2020), também utilizando beta-glucana extraídas de *S. cerevisiae* mas na dose estimada de 11 mg/kg de peso vivo (V.O.), não identificaram incremento na capacidade fagocitária de neutrófilos em relação ao grupo controle. Outra via de aplicação da beta-glucana é a injetável, que devido a sua interação com o sistema imunológico, a beta-glucana tem sido estudada adicionada como partículas adjuvantes em vacinas quanto a sua capacidade de carrear antígenos às células apresentadoras de antígenos com resultados promissores (Vetvicka et al., 2020).

Todavia, apesar das potencialidades, o pequeno volume de experimentos que avaliam os efeitos da beta-glucana sobre a modulação do sistema imune de bovinos apresenta grandes lacunas científicas e, em alguns casos, resultados antagônicos. Diversos estudos utilizam formas diferentes de obtenção da beta-glucana como produtos da fermentação ou apenas a parede do *Saccharomyces cerevisiae* ou ainda a beta-glucana isolada. O tipo de desafio imposto ao animal, os diferentes animais utilizados e o tempo de suplementação também diferem entre os estudos. Além disso, a dose utilizada não está bem estabelecida ou padronizada (Burdick et al., 2021). Esta observação é reforçada pela ausência de ensaios clínicos de dose/resposta na espécie, o que resulta na falta de determinação da natureza da relação de resposta à dose administrada. Assim, tais condições limitam tanto o uso biotecnológico, quanto o uso deste biopolímero para promover a imunomodulação em bovinos nos sistemas produtivos.

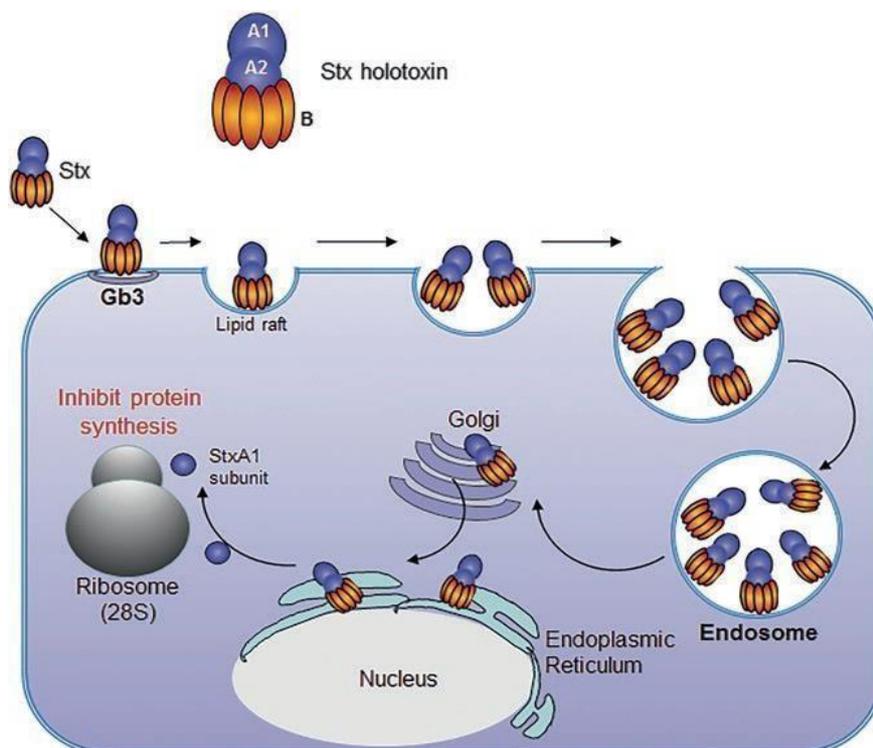
1.2 *E. coli* STEC/ETEC

Existem seis tipos de *E. coli* patogênicas intestinais bem definidos. A *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e a *E. coli* difusamente aderente (DAEC). A *E. coli* enterotoxigênica é o principal patógeno intestinal, causando diarreia principalmente em crianças suscetíveis menores de 5 anos e adultos viajantes por áreas endêmicas. Experimentos demonstraram que nem todos os animais expostos a *E. coli* são infectados mesmo com doses até 10^8 ufc e que a dose infectante pode ser variável conforme a idade e as condições nutricionais, genética, ambientais, imunidade e doenças concomitantes (Besser et al., 2001; Windeyer et al., 2014). A transmissão se faz através do consumo

de água e alimentos contaminados pelas fezes de animais que constituem um importante reservatório (Croxen et al., 2013). A patogênese da diarreia está ligada aos fatores de colonização (FC) presentes na superfície da parede bacteriana, e especialmente, na sua capacidade de produzir e liberar toxinas. O principal FC são polímeros proteicos filamentosos extracelulares conhecidos como fímbrias que atuam na aderência da bactéria a superfície epitelial, na motilidade bacteriana e na formação de biofilme (Madhavan and Sakellaris, 2015). Há mais de 25 tipos de FC descritos que se ligam a glicoproteínas e glicosíngolípides da membrana celular e parecem ser espécies específicas (Zhang et al., 2022). A STEC/ETEC possui adesinas e fímbrias que aderem à superfície epitelial do intestino delgado (Madhavan et al., 2015). As toxinas são classificadas em termolábil (TL) com 5 variantes e termoestável (TE) com 3 variantes. A TL formada por 5 subunidades B que circundam 1 subunidade A, é transportada através da membrana celular bacteriana e liga ao lipopolissacáride (LPS) da superfície externa. Forma-se então uma vesícula contendo várias moléculas de TL. Existe vários receptores nas células epiteliais do intestino delgado onde a TL pode-se ligar. O principal deles é o monosialogangliosídeo (GM1). A TL secretada pela *E. coli*, liga-se ao GM1, é internalizada pela célula epitelial, transportada por um fagossomo até o retículo endoplasmático rugoso ativando uma cascata enzimática que aumenta a adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e culmina com a abertura de poros da membrana celular epitelial e liberação de eletrólitos e água. De outra forma, a TE secretada liga-se a guanilato ciclase C (GC-C) uma proteína transmembrana epitelial que atua como receptor na borda em escova das células epiteliais de intestino delgado. A ligação TE-GC-C ativa sua porção catalítica intracelular que resulta no acúmulo de guanilato ciclase cíclico (GMPc) que atua na patogênese da diarreia por 2 vias: liberação de cloreto e bicarbonato por canais transmembrana e impedindo a reabsorção de água e sódio na borda em escova do epitélio (Figura 2). Por fim, o acúmulo de eletrólitos e água na luz intestinal produz o principal sintoma da infecção por *E. coli*, a diarreia (Zang et al, 2022). Portanto os sintomas da doença são diarreia aquosa e prostração, associados a dores de cabeça e abdominais, vômitos e febre.

parece ser mais virulenta que as formas isoladas e isso pode ser um grande problema de saúde pública exigindo maior cuidado e vigilância epidemiológica (Nyholm et al., 2015). A STEC é encontrada no intestino de bovinos que são o seu maior reservatório, pode provocar diarreia e colonizar a mucosa por um longo período (Menge et al., 2020). Em humanos, mas não em bovinos, causa diarreia, colite hemorrágica e Síndrome hemolítico-urêmica (SHU). A forma de doença mais grave causada pela STEC é a SHU que se inicia em 5 dias após infecção e cursa com trombocitopenia, anemia e insuficiência renal aguda e mais tarde com complicações cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicas e doença renal crônica (Croxen et al., 2013). Porém o fato de esta complicada forma de doença não ocorrer em bovinos parece estar associada a ausência do receptor de membrana Gb3 (*globotriaosylceramide*) da Stx em suas células endoteliais intestinais (Celi et al., 2022; Pruimboom-Brees et al., 2000). O receptor Gb3 está presente nas células epiteliais da base das criptas e em leucócitos da mucosa de jejuno e íleo (Chu, 2010; Menge et al., 2020). Ao entrar em contato com as células epiteliais do intestino a STEC liga-se a elas através de fimbrias (Croxen et al., 2013). A Stx liberada pela lise do fagossomo, liga-se ao receptor Gb3 através das 5 subunidades B, sofre endocitose e é transportada ao retículo endoplasmático onde é clivada e libera a subunidade ativa A que bloqueia a capacidade de síntese proteica do ribossomo levando a célula ao estresse via produção de ROS e à apoptose via caspase (Celi et al., 2022) (Figura 3). O tratamento da diarreia baseia-se em reidratação e uso de antibióticos que pode gerar resistência bacteriana e eliminação da microbiota intestinal. O uso de antibióticos não é recomendado em infecções por STEC pois provoca lise bacteriana e consequente liberação da Stx e piora da doença (Croxen et al., 2013). Diante disto faz-se necessário estratégias que possam diminuir o risco de infecção, o desenvolvimento da doença grave e o uso de antibióticos. Entender a patogênese da *E. coli* é parte essencial para o desenvolvimento de estratégias que visem minimizar a contaminação, a infecção e suas consequências.

Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de ação da Shigatoxina que é internalizada e transportada até o Complexo de Golgi e retículo endoplasmático



A Shigatoxina que é internalizada e transportada até o complexo de Golgi e retículo endoplasmático Fonte: BHUNIAAK, 2018.

1.3 RESPOSTA IMUNE FRENTE A INFECÇÃO DE *E. COLI*

A microbiota exerce um papel importante na proteção da saúde intestinal participando da regulação metabólica, nutricional e do sistema imune, bem como proteção contra bactérias patogênicas (Kamada et al., 2013). Moléculas bioativas como ácidos graxos de cadeias curtas, sais biliares secundários e bacteriocinas produzidas por bactérias podem impedir o crescimento de patógenos. Os ácidos graxos resultam do metabolismo bacteriano de polissacárides não digeridos pelo organismo (Dalile et al., 2019). Os sais biliares produzidos no fígado, para auxiliar a digestão, podem ser metabolizados pela microbiota e se tornam sais biliares secundários que possuem ação antibacteriana (Tian et al., 2020). A microbiota estimula também o sistema imunológico atuando no combate a infecções intestinais (Cebra et al., 2005). Cepas de *E. coli* não patogênicas fazem parte da microbiota intestinal e possuem ação anti-inflamatória inibindo a produção de interleucinas pró-inflamatórias como IL6, IL8, IL1-

b e TNF- α , além de ação citotóxica em cultura células cancerígenas mamárias, colônicas e leucêmicas através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (Nakkarach et al., 2021). Porém cepas de *E. coli* patogênicas possuem ação pró-inflamatória sobre o sistema imune. Foi demonstrada a incubação de células epiteliais humanas com *E. coli*, a ativação do fator de transcrição NF- κ B e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL8, TNF- α e INF- γ (Gupta et al., 2021). O lipopolissacáride (LPS) que é o principal componente da parede de bactérias Gram-negativas é também um importante fator de virulência. O LPS liga-se a diversos receptores de padrão de reconhecimento (PRRs) como TLR4 e CD14 e ativa a via do NF- κ B determinando a transcrição de quimiocinas e citocinas inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (Zaatout et al., 2022). Há ainda evidências de que doenças inflamatórias intestinais como Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa estão associadas à infecção por *E. coli* (Kamali et al., 2021).

No entanto a STEC/EPEC, produtora de shigatoxina, parece exercer um papel inibitório sobre o sistema imune. A Stx tem ação imunossupressora em bovinos o que explicaria a persistência da *E. coli* patogênica no intestino destes animais e consequente prolongada liberação nas fezes. Linfócitos bovinos jovens possuem baixos níveis de Gb3/CD77 que ao se ligar à Stx impede que os linfócitos progridam na sua diferenciação em células efetoras e induzem apoptose (Menge, 2020). Linfócitos intraepiteliais da mucosa intestinal bovina também possuem receptores Gb3/CD77 e são em sua maioria linfócitos T CD3+ especialmente LTCD8+ envolvidos na lise de células infectadas e regeneração epitelial. O dano causado à mucosa estaria associado ao caráter prolongado da infecção devido a ação imunossupressora da Stx (Stein et al., 2020). Foi demonstrado que linfócitos TCD4+ produzem IL4 por estímulo da STx. A IL4 tem sido associada a indução da apoptose em monócitos do sangue periférico e diminuição da ativação dos LTCD8 intraepiteliais (Menge et al., 2004; Stein et al., 2020). Estudos evidenciaram a diminuição da proliferação de linfócitos da placa de Peyer, principalmente LTCD4, na presença de Stx sem que haja aumento das citocinas pró-inflamatórias INF- α , INF- γ , TNF- α e IL12 (Chu, 2010). Por outro lado, os macrófagos são resistentes a ação citotóxica da Stx e são estimulados a produzirem de IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-8 direcionando o sistema imune para uma resposta inflamatória e adaptativa tipo Th2 (Tesh et al., 1994; Menge, 2020). A ligação da STEC nas células epiteliais intestinais (CEIs) na base das

criptas induz a liberação de quimioatraentes pelas células epiteliais promovendo a migração e inibindo a apoptose de neutrófilos, provocando danos e facilitando a passagem da Stx através do epitélio (Hurley et al., 2001). Estudos sugerem que a adesão de STEC e a ação da Stx na base das criptas próximo ao tecido linfóide da Placa de Peyer seja uma forma estratégica para que a toxina exerça sua atividade imunomoduladora (Chu, 2010). As CEIs são ainda resistentes à citotoxicidade da Stx uma vez que possui isoformas do receptor Gb3/CD77 que conduzem a Stx à degradação lisossomal impedindo sua ação sobre o retículo endoplasmático rugoso e a morte celular (Hoey et al, 2003).

A infecção pela STEC/EPEC provoca uma série de alterações no funcionamento tanto das células epiteliais quanto das células do sistema imunológico relacionadas a mucosa, mais propriamente da placa de Peyer. Se por um lado a *E. coli* é capaz de ativar o sistema imunológico devido aos seus diversos fatores de virulência, a STEC/EPEC tem também ação imunossupressora exercida pela Stx.

Diante destas desafiadoras formas de interação entre imunossupressão e imunoestimulação provocadas pela STEC/EPEC, a crescente resistência a antibióticos, sua longa permanência no intestino de bovinos fazendo com que se tornem o principal reservatório deste patógeno e seus efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal, e a expectativa de utilização da beta-glucana como uma promissora molécula imunomoduladora, espera-se que estudos de dose/resposta tragam um melhor entendimento da sua ação sobre o sistema imune e que propiciem seu uso para um melhor enfrentamento das infecções provocadas pelas diversas cepas de *E. coli* patogênicas em sistemas bovinos produtivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Definir uma dose diária de beta-glucana que gere um efeito protetivo para bezerros desafiados com *STEC/ETEC*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

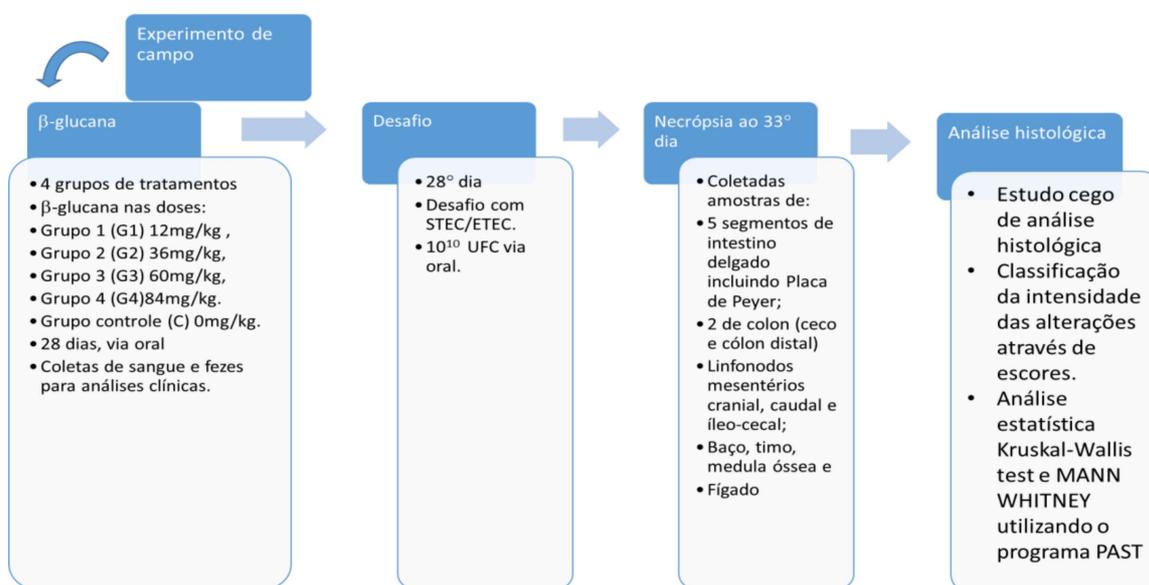
- Avaliar as alterações histopatológicas no sistema digestório de bezerros tratados com diferentes doses de beta-glucana e desafiados com *STEC/ETEC*.
- Avaliar as alterações histopatológicas nos órgãos hematolinfóides de bezerros tratados com diferentes doses de beta-glucana e desafiados com *STEC/ETEC*.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi devidamente aprovado na CEUA da Embrapa Gado de Leite sob nº8734060422 (Anexo A). Todo o experimento de campo foi conduzido ao longo de 90 dias. O experimento realizado é um delineamento do tipo estudo clínico em paralelo com 6 repetições por tratamento perfazendo 30 animais. Cada animal permaneceu em experimentação por um período de 33 dias, no Campo Experimental EMBRAPA Gado de Leite. Foram administrados cinco níveis de doses orais de beta-glucana diárias durante todo o período experimental (0, 12, 36, 60 e 84 mg/kg de peso vivo de beta-glucana/dia). Os animais foram pesados a cada 14 dias para ajuste da dose. Os bezerros lactentes entraram no experimento no 60º dia de vida. No vigésimo oitavo dia de experimento os animais foram desafiados com uma estirpe de *E. coli* categorizada com patotipo STEC/ETEC e utilizada no experimento (Anexo B). A bactéria é autógena da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite e foi caracterizada molecularmente para os genes *Stx*, *Stx* e fímbria K99. Procedeu-se ao desafio em dose única, via oral de 10^{10} UFC diluída em leite (Figura 4). No quinto dia após a infecção experimental os animais foram sacrificados, para coleta dos tecidos: medula óssea, timo, fígado, baço, linfonodos mesentéricos cranial e caudal e linfonodo íleo cecal, segmentos intestinais de duodeno, jejuno proximal, médio e distal, íleo, cecocolon para análises histopatológicas.

Figura 4 – Delineamento experimental



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

3.2 NECROPSIA

A eutanásia foi realizada em 6 animais de cada grupo por administração intravenosa de 0,1mg/Kg de cloridrato de xilazina como medicação pré-anestésica, seguida de administração intravenosa de 25mg/Kg de tiopental sódico e uma vez constatada ausência de reflexo corneal, foi administrada solução intravenosa de 150mg/Kg de cloreto de sódio. Para a análise histopatológica foram coletadas amostras de Duodeno (no início do intestino delgado), Jejunum proximal (2 metros após a coleta do duodeno), Jejunum médio (1 metro após a coleta do jejunum proximal), Jejunum distal (1 metro após a coleta do Jejunum médio), 1 amostra de íleo com placa de Peyer, 1 amostra de ceco, 1 amostra de cólon, e 1 amostra de cada um dos seguintes órgãos: linfonodo mesentérico cranial, linfonodo mesentérico caudal, linfonodo íleo-cecal, baço, timo, medula óssea esternal e fígado (Figura 5).

3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As amostras foram fixadas por 24h em solução de formol a 10%, logo após, fragmentos de 4mm de espessura foram selecionados para processamento histológico com as seguintes etapas: fixação em formol a 10%, desidratação em álcool etílico 70%,

80% e 98%, clarificação em 3 banhos de xilol, infiltração por parafina líquida em 2 banhos e inclusão em parafina (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática da coleta de material e processamento histológico.



1- materiais coletados do intestino delgado e colon, linfonodo, baço, fígado, timo e medula óssea. 2- fixação em formol a 10%. 3 - Processamento histológico. 4 – inclusão em parafina. 5 – Confeção de lâminas histológicas coradas em Hematoxilina-eosina. 6 – análise de lâminas, estatística e fotografias. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

3.4 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Foram realizados cortes de 4 micrometros de espessura. Os cortes foram desparafinados em estufa 60°C e em seguida clarificados em 3 banhos em xilol e hidratados em água destilada. A coloração se deu com solução de hematoxilina de Harris por 6 a 10 minutos, lavagem em água corrente por 5 minutos e contracoloração com eosina por 2 minutos. Procedeu-se à desidratação em 3 banhos

de álcool absoluto, clarificação em 3 banhos de xilol e montagem com verniz e lamínula.

3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Todas as análises histopatológicas foram realizadas com esquema cego, para evitar influência de interpretação da patologista. Foi realizada uma análise semiquantitativa e afim de padronizar a análise morfológica foi elaborado um protocolo (Anexo B) em que as alterações foram graduadas pelo método de scores (Anexo C) baseado nos trabalhos de HALL et al., 1988; BERG et al., 1996 e DIELEMAN et al., 1998.

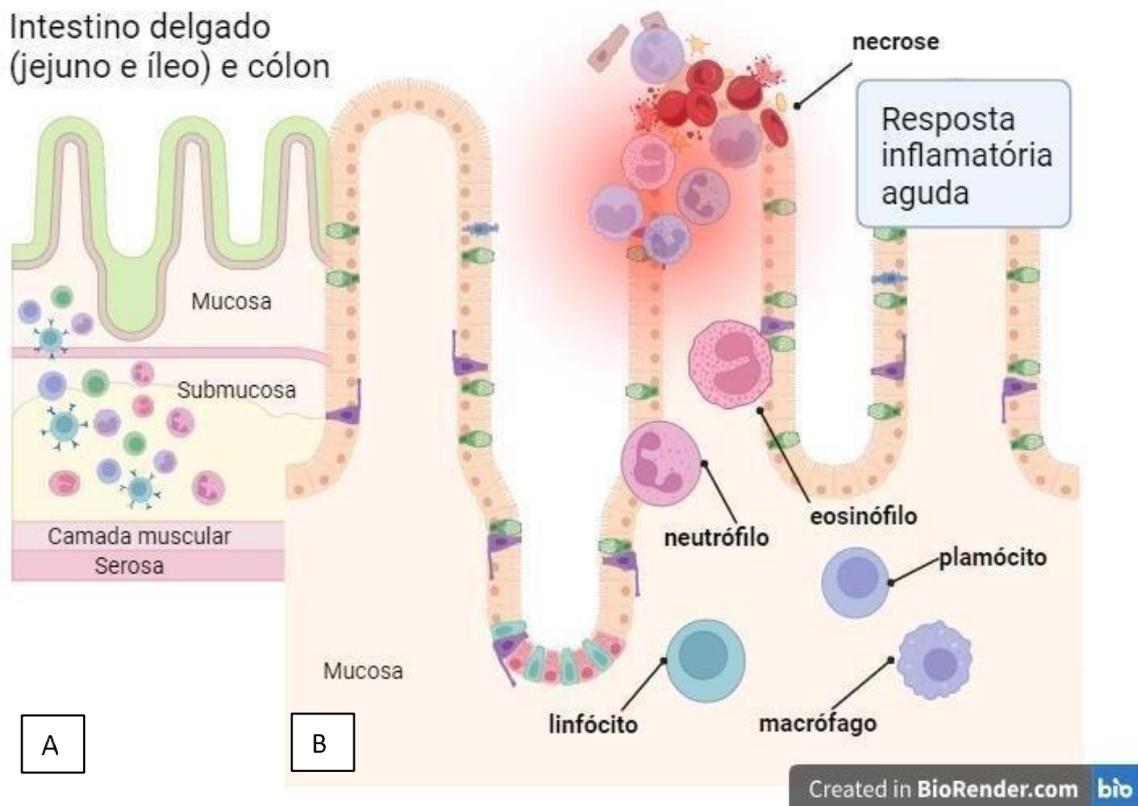
3.5.1 Parâmetros das análises de duodeno, jejuno, íleo e cólon

Foram realizados três cortes histológicos de duodeno, jejuno e íleo e 1 corte das demais áreas coletadas e submetidos a análise por escores. As amostras de duodeno, jejuno, íleo e cólon foram analisadas sob 7 aspectos (Tabela 1, Figuras 6 e 7) que poderiam estar presentes avaliando-se toda a superfície de corte de tecido presente na lâmina histológica.

Tabela 1- Aspectos morfológicos analisados nas amostras de duodeno, jejuno, íleo e cólon e scores utilizados para classificar as alterações.

Aspectos morfológicos	Escores
Presença de infiltrado linfoplasmocitário em lâmina própria	1- normal, 2- focal e 3- difuso
Profundidade do infiltrado nas camadas da parede intestinal	1-mucosa, 2-submucosa, 3-muscular própria, 4-subserosa, 5- serosa
Resposta inflamatória aguda	1- ausente, 2- presença de neutrófilos na lâmina própria, 3- microabscessos de criptas, 4- erosão, 5- pseudomembrana, 6-úlcera e 7- perfuração
Presença de fibrina	1- ausente, 2- presente
Presença de hemorragia	1- ausente, 2- leve, 3- franca
Presença de necrose	1- ausente, 2- focal, 3- extensa superficial e 4- extensa profunda
Regeneração da mucosa	1- ausente, 2- focal e 3- extensa
Aspectos da Placa de Peyer (exclusivas amostras do íleo)	1- normal, 2- hiperplasia linfóide e 3- presença de microabscessos

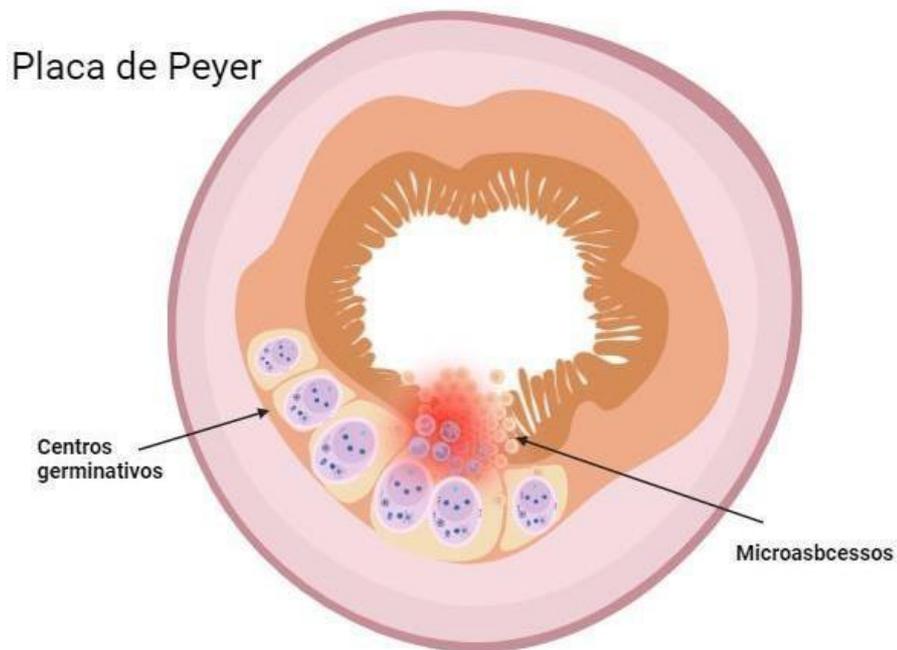
Figura 6 – Representação esquemática de mucosa de intestino delgado.



A – ilustração das camadas da parede intestinal (mucosa, submucosa, camada muscular e serosa). B – ilustração das células participantes da resposta inflamatória aguda e seus efeitos de necrose e hemorragia. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Para avaliar o impacto global destas alterações sobre a saúde animal elaborou-se o Índice de necrose intestinal total (INI) e o Índice de saúde intestinal (ISI). O INI foi gerado calculado somando-se os escores de necrose de todos os segmentos do intestino delgado com os valores do ceco e do cólon de cada animal. Adicionalmente, o ISI foi calculado, somando-se os escores INI de cada animal, aos escores de microabscessos e hiperplasia da Placa de Peyer atribuindo para a presença destes dois últimos os valores de -2 e -1 respectivamente. Isso ocorre pois ambos estão relacionados a uma efetiva resposta imune durante o enfrentamento da infecção.

Figura 7 –Representação esquemática da parede do íleo
com Placa de Peyer.



Folículos linfóide constituintes da Placa de Peyer e os microabscessos. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

3.5.2 Parâmetros das análises de linfonodos, baço, timo e medula óssea

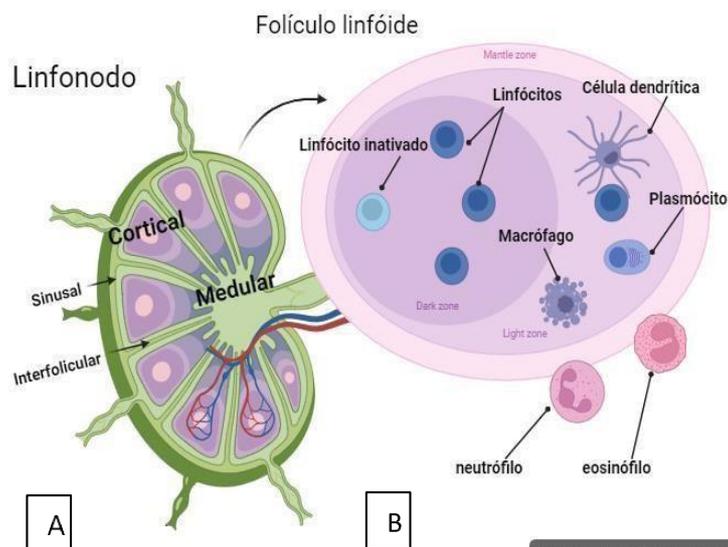
Na análise dos órgãos linfóides buscou-se observar alterações relacionadas ao padrão de ativação do sistema linfóide bem como os tipos celulares envolvidos (Tabela 2, Figuras 8, 9, 10 e 11).

Tabela 2 - Aspectos morfológicos analisados nas amostras de linfonodos, baço, timo e medula óssea e escores utilizados para classificar as alterações.

Órgãos	Escores
Linfonodos	1- hipoplasia linfoide, 2- hiperplasia de padrão folicular, interfolicular ou sinusal, 3- presença de neutrófilos e eosinófilos e 4- necrose.
Baço	1- normalidade, 2- hiperplasia de padrão folicular, 3- hiperplasia de padrão interfolicular ou sinusal, 4- hipoplasia linfoide, 5- necrose, 6- presença de neutrófilos, 7- presença de eosinófilos, 8- presença de granulomas
Timo	1- normal, 2- hiperplasia medular, 3- hiperplasia cortical, 4- involução tímica, parênquimaliposubstituído, 5- necrose, 6- presença de neutrófilos, 7- presença de eosinófilos e 8- presença de granulomas.
Medula óssea	
Celularidade global	0 a de ocupação dos espaços 100% o intertrabecul ares
Linfócitos	1- presente, 2- ausente
Maturação granulocítica, eritróide e megacariocítica	1- alterada, 2- normal

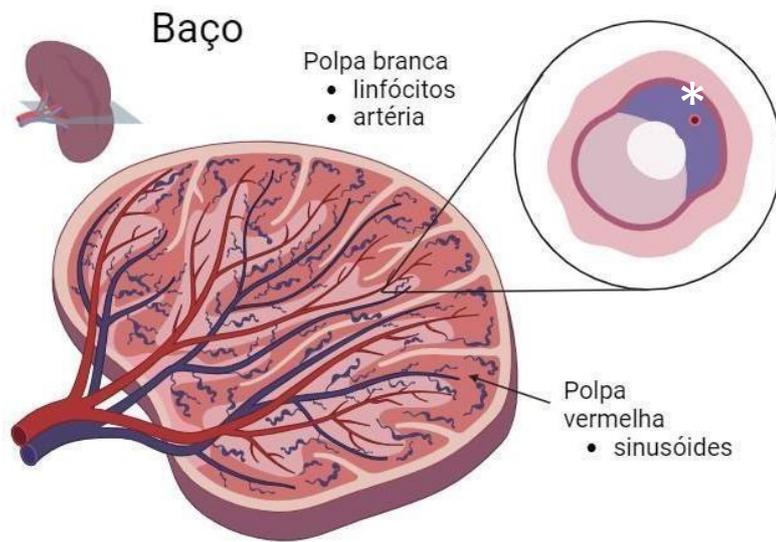
Transformação gelatinosa de (depósito mucopolissacárides extracelular; BOHM, 2000)	1- presente, 2- ausente
Fibrose	1- presente, 2- ausente
Granuloma	1- presente, 2- ausente,

Figura 8 – Representação esquemática do linfonodo e do folículo linfóide.



A: regiões do linfonodo (cortical, medular, sinusal e interfolicular). B: folículo linfóide e as células presentes em cada uma das regiões. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

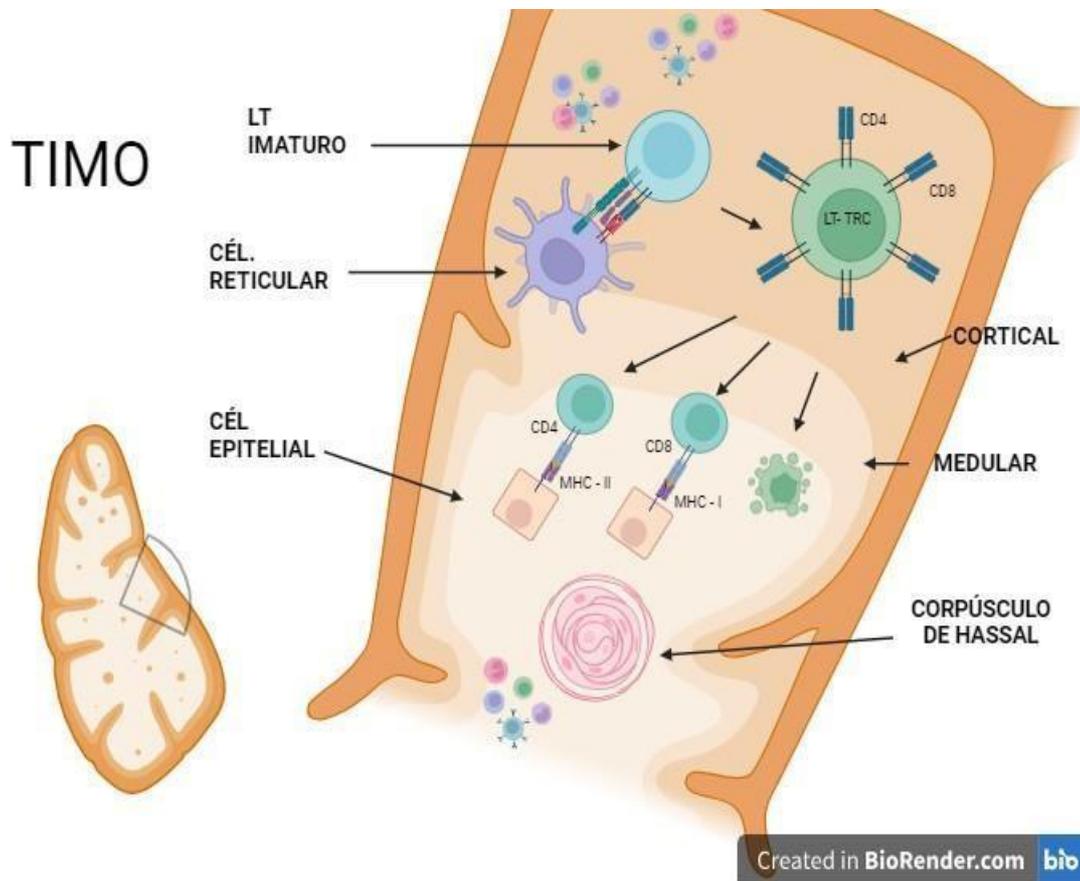
Figura 9 – Desenho esquemático do baço.



Created in BioRender.com bio

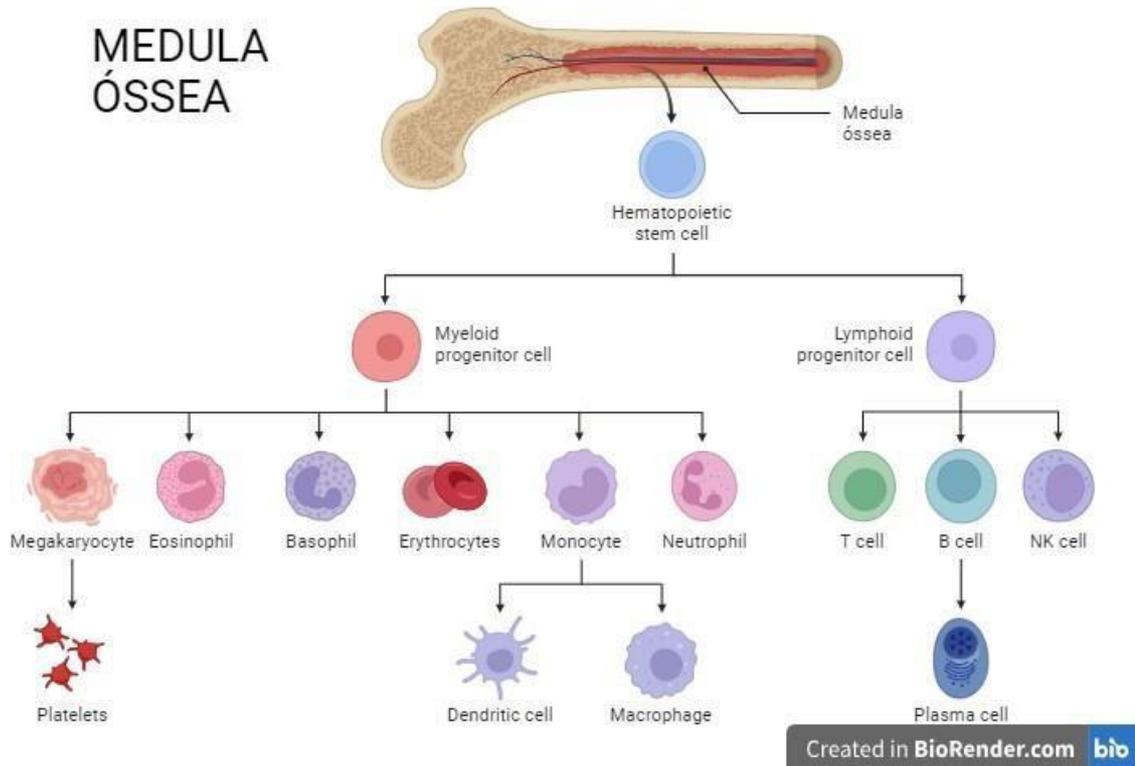
Polpa vermelha é bastante vascularizada possuindo na uma rica rede de sinusóides preenchidos por hemácias. Polpa branca possui agregados linfoides semelhantes aos folículos linfonodais porém possuem uma artéria central (*). Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 10 – Representação esquemática do timo.



O timo possui a região cortical onde encontram-se os linfócitos T imaturos que, interagindo com as células reticulares, expressarão CD4 e CD8 e sofrerão seleção positiva aqueles que se ligarem ao MHC ou sofrerão apoptose aqueles que não se ligarem ou ligarem fracamente. Na região medular, expressando isoladamente CD4 ou CD8 e interagindo com as células epiteliais, sofrerão seleção negativa aqueles que reagirem a antígenos próprios sendo então eliminados por apoptose. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 11 – Representação esquemática da medula óssea.



A medula óssea possui os precursores mielóides que chegarão a fase madura e circularão pelo sangue e os linfóides que se encaminharão para o timo (linf. T) e linfonodos (linf. B). Fonte: Elaborado pela autora (2024).

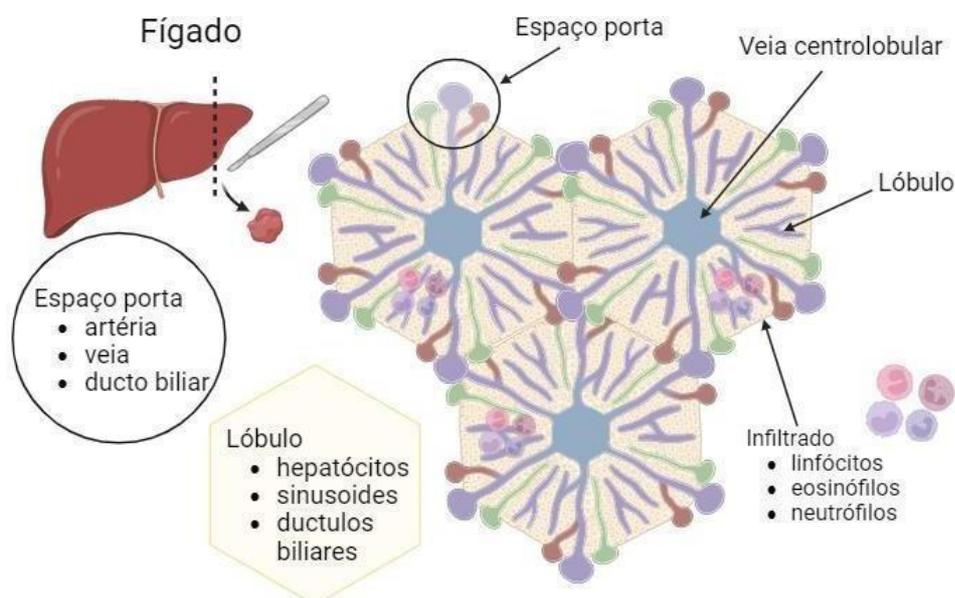
3.5.3 Parâmetros das análises do fígado

No fígado foram avaliadas alterações relacionadas ao comprometimento do parênquima hepático lobular, espaço porta e veia centrolobular por infiltrado de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, alterações dos hepatócitos, da secreção biliar e alterações em vasos (Tabela 3, Figura 12).

Tabela 3 - Aspectos morfológicos analisados nas amostras de fígado

Aspectos morfológicos	Scores
Infiltrado linfoplasmocitário, neutrofilico e eosinofílico portal	1- presente ou 2- ausente
Infiltrado linfoplasmocitário, neutrofilico e eosinofílico lobular	1- presente ou 2- ausente
Esteatose macrovesicular ou microvesicular	1- presente ou 2- ausente
Balonização	1- presente ou 2- ausente
Colestase	1- presente ou 2- ausente
Venoclusão ou vasculite	1- presente ou 2- ausente
Granuloma	1- presente ou 2- ausente

Figura 12 - Representação esquemática do fígado.



O parênquima hepático é constituído por lóbulos contendo hepatócitos organizados em trabéculas permeadas por ductulos biliares e sinusóides que desembocam de um lado na veia centrolobular e por outro na veia existente nos espaços portas que contém também uma artéria e o ducto biliar. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

3.6 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto a normalidade dos resíduos foram por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilks. Os tratamentos foram contrastados pelo teste Kruskal-Wallis e, quando identificada a existência de diferenças, a verificação de significância estatística foi avaliada pelo teste de DUNN's. Quando possível, foi realizado o cálculo da estatística da mediana, a qual leva em consideração a natureza ordinal dos dados. Todos os procedimentos inferenciais foram realizados ao nível nominal de 5% de significância e para manter esse nível de significância global, quando necessária, foi utilizada a correção de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software livre Past (Hammer et al., 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos primeiros dias de vida, grande parte da nutrição e proteção imunológica dos bezerros recém-nascidos provem do colostro. As primeiras 72 horas de vida do bezerro são críticas no processo de transferência e estabelecimento da imunidade passiva, nesse período, a alta permeabilidade intestinal permite que as imunoglobulinas, citocinas e leucócitos presentes no colostro sejam absorvidas para compor as defesas dos recém-nascidos nos primeiros meses de vida (Chase et al., 2008; Lopez et al., 2022; Novo et al., 2017). Do ponto de vista imunológico, no primeiro mês de vida, o bezerro é altamente dependente da imunidade passiva para sua sobrevivência, isso ocorre porque apesar de possuir todos os componentes do sistema imune, muitos ainda não estão funcionais (Chase et al., 2008; Lopez et al., 2022). A medida que o tempo passa, os componentes do sistema imune vai amadurecendo e o recém-nascido entra em contato com antígenos ambientais para formar sua imunidade adquirida e, com isso, a importância da imunidade passiva vai perdendo relevância na imunidade “global” do bezerro (Lopez et al., 2022). Neste contexto, a função dos neutrófilos vai melhorando gradativamente até os 5 meses de idade, quando atinge os mesmos níveis um bovino adulto (Chase et al., 2008). Segundo os autores, há uma janela imunológica de alta suscetibilidade à infecções e resposta a vacinais menos pronunciada. Em adição, nesse período de vida dos bezerros, da mesma forma que o sistema imune ainda não está maduro, a mucosa intestinal também não está totalmente desenvolvida, o que eleva ainda mais sensibilidade dos animais frente ao contato com microorganismos patogênicos durante o período de desmame (Silva et al., 2023). Assim, considerando a vulnerabilidade intrínseca do sistema imune de bezerros durante o período de desmame, estimular sua capacidade de resposta imunológica com o auxílio de imunomoduladores é uma estratégia promissora para promover a redução de uso de antibióticos e a saúde de bezerros nesta etapa da criação. Conforme previamente abordado na revisão de literatura, a beta-glucana apresenta grande potencial para promover a melhorias na capacidade de resposta imune, em especial na resposta imune inata. Em função disso, seu uso como imunomodulador tem potencial para contribuir para a redução do uso de antibióticos nessa fase da criação. Entretanto, o uso oral da beta-glucana em indivíduos saudáveis não induz a produção de alterações sistêmicas evidentes nos parâmetros imunológicos, o que dificulta a definição da dose

de uso desse biopolímero (Murphy et al., 2020). Para contornar esta dificuldade, a realização de desafios experimentais com patógenos específicos podem favorecer a identificação de respostas biológicas mais facilmente mensuráveis.

Especificamente, a *E. coli* é uma das principais bactérias patogênicas para bezerros nos primeiros dias de vida, sendo que sua susceptibilidade à infecção pode se estender até o terceiro ou quarto mês de vida (Acras, 1985; Dall Agnol et al., 2021; Ok et al., 2009). Do ponto de vista epidemiológico, este patógeno possui alta transmissibilidade entre animais da mesma espécie e de espécies distintas, onde animais infectados liberam altas concentrações de bactérias em suas fezes por períodos prolongados (Besser et al., 2001; Eldesoukey et al., 2022). A infecção por *E. coli* além do risco de morte e diminuição do desenvolvimento ponderal, também pode impactar a saúde animal como um todo, pois prejudica a função imune, altera a barreira intestinal, induz a produção de lesões teciduais facilmente identificáveis e reduz a absorção de nutrientes (He et al., 2022). Em adição, durante o processo de estabelecimento da infecção por *E. coli*, a resposta imune inata apresenta relevante importância em relação a forma da manifestação (assintomática ou sintomática) e na velocidade de resolução da infecção (Long et al., 2010). Destarte, em função da facilidade de cultivo; da patogênese e tipos de lesões causadas durante a infecção; da importância no sistema produtivo bovino; e do potencial zoonótico, o uso da *E. coli* em desafios experimentais de bezerros pode facilitar a identificação *in vivo* de alterações histopatológicas que possam contribuir para definir doses efetivas para o uso da beta-glucana em bovinos.

Dentro do nosso conhecimento, este foi o primeiro experimento do tipo dose resposta em paralelo, no qual bezerros previamente tratados com diferentes doses de beta-glucana foram desafiados com um patotipo de *E. coli* STEC/ETEC e as alterações histopatológicas foram utilizadas para avaliar a capacidade de resposta do sistema imune do animal. Para tanto, foram inicialmente avaliadas as alterações histopatológicas intestinais causadas pela infecção e, na sequência, a fim de observar reflexos nos órgãos sistêmicos foram avaliadas as alterações histopatológicas dos principais órgãos envolvidos na resposta imune.

4.1 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INTESTINAIS

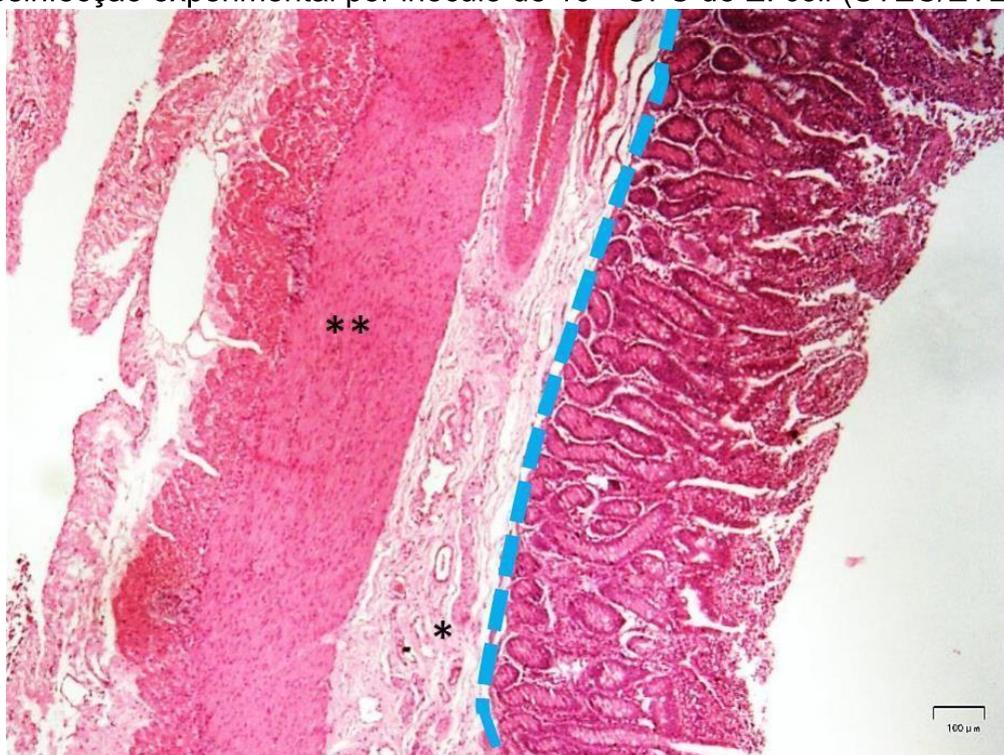
No intestino, foram avaliados o duodeno, o jejuno proximal, o jejuno médio, o jejuno distal, o íleo, o ceco e o cólon distal. Neles, foram avaliadas a intensidade e a profundidade nas camadas da parede onde o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário se localizava; sinais de resposta inflamatória aguda; presença de depósito de fibrina na serosa; intensidade de hemorragia e de necrose; sinais de regeneração da mucosa; e características da Placa de Peyer, quando pertinente.

Nenhum animal apresentou presença de fibrina na serosa ao longo de todo o intestino. A presença de fibrina na serosa foi avaliada como um dos parâmetros de graduação da resposta inflamatória, haja vista que em situações em que o acometimento inflamatório é intenso, pode ocorrer depósito de fibrina como uma expressão de um comprometimento da cavidade peritoneal (Rotstein, 1992). Da mesma forma, ao longo de todo o intestino, nenhum tratamento apresentou diferença estatística nos parâmetros profundidade e intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Uma possível explicação para a ausência de diferença nos parâmetros de profundidade e intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário pode ser atribuída ao fato de que a resposta inflamatória aguda é parte da resposta inata, é imediata e não específica. Inicia-se com recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local de injúria devido à ligação de receptores toll-like (TRLs) a mediadores inflamatórios como os lipopolissacárides presentes na membrana celular de bactérias Gram negativas como *E. coli* (Hannood et al., 2022). Assim, considerando-se a patogênese da infecção intestinal por *E. coli*, a qual apresenta tipicamente as etapas de aderência, replicação do patógeno, inflamação intestinal e lesão celular com pronunciado infiltrado celular inflamatório (Govindarajan et al., 2020; Kaper et al., 2004) o achado de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em todos os segmentos intestinais é coerente com o processo de infecção gerado pela *E. coli* nos bezerros. É importante destacar que o inóculo de *E. coli* utilizado no experimento tenha sido um pouco forte e tenha contribuído para nivelar alguns parâmetros entre os tratamentos. De fato, essa observação está em acordo com o reportado por Larzábal e colaboradores (2020), onde relatam que um inóculo infeccioso de *E. coli* patogênica contendo 10^{10} UFC é considerado elevado para bezerros.

Ao longo do intestino delgado nenhum bezerro apresentou sinais de regeneração tecidual, por outro lado, quase que a totalidade dos animais apresentou infiltrado

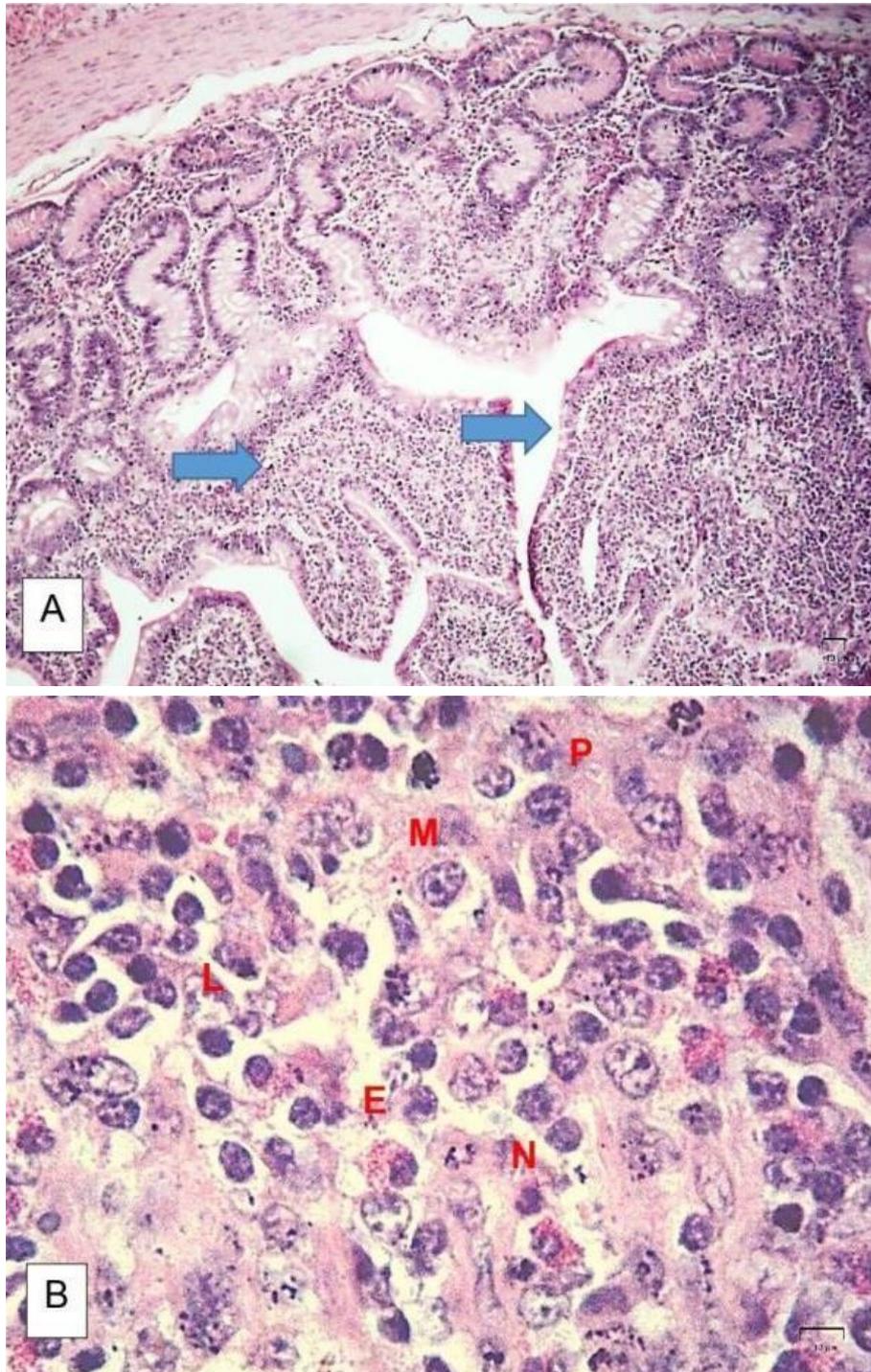
linfoplasmocitário difuso. Destaca-se que apenas dois animais do grupo controle e dois do grupo 2 exibiram infiltrado inflamatório focal. Nestes animais as alterações se concentraram nos segmentos duodeno, jejuno proximal e jejuno médio, exceto em um animal do grupo 2 cujas alterações ocorreram no jejuno distal e íleo. Exemplificando as lesões supradescritas, na figura 12 pode-se observar um infiltrado linfoplasmocitário difuso e restrito à lâmina própria, sem estender-se às demais camadas da parede intestinal. Por sua vez, a figura 13 evidencia um infiltrado linfoplasmocitário focal.

Figura 12 - Fotomicrografia representativa de duodeno de bezerros no quinto dia pós-infecção experimental por inóculo de 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).



Linha azul evidencia infiltrado inflamatório difuso restrito a lâmina própria, sem atingir as demais camadas da parede intestinal (submucosa* e muscular própria**). Coloração HE, aumento 40X. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 13 – Fotomicrografia representativa de jejuno proximal de bezerros no quinto dia pós infecção experimental por inóculo de 10^{10} UFC de *E. Coli* (STEC/ETEC).



A - infiltrado inflamatório focal limitado a lâmina própria das vilosidades (setas azuis, 10X). B - Detalhe do infiltrado inflamatório com linfócitos (L), plasmócitos (P), eosinófilos (E), neutrófilos (N) e macrófagos (M) em lâmina própria (100X), coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Ao avaliar os segmentos mais iniciais do intestino, *i.e.* o duodeno e o jejuno proximal, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para as demais variáveis. Em função do comportamento similar das alterações para as outras variáveis, apenas os valores de inflamação aguda, hemorragia e necrose estão apresentados na tabela 4.

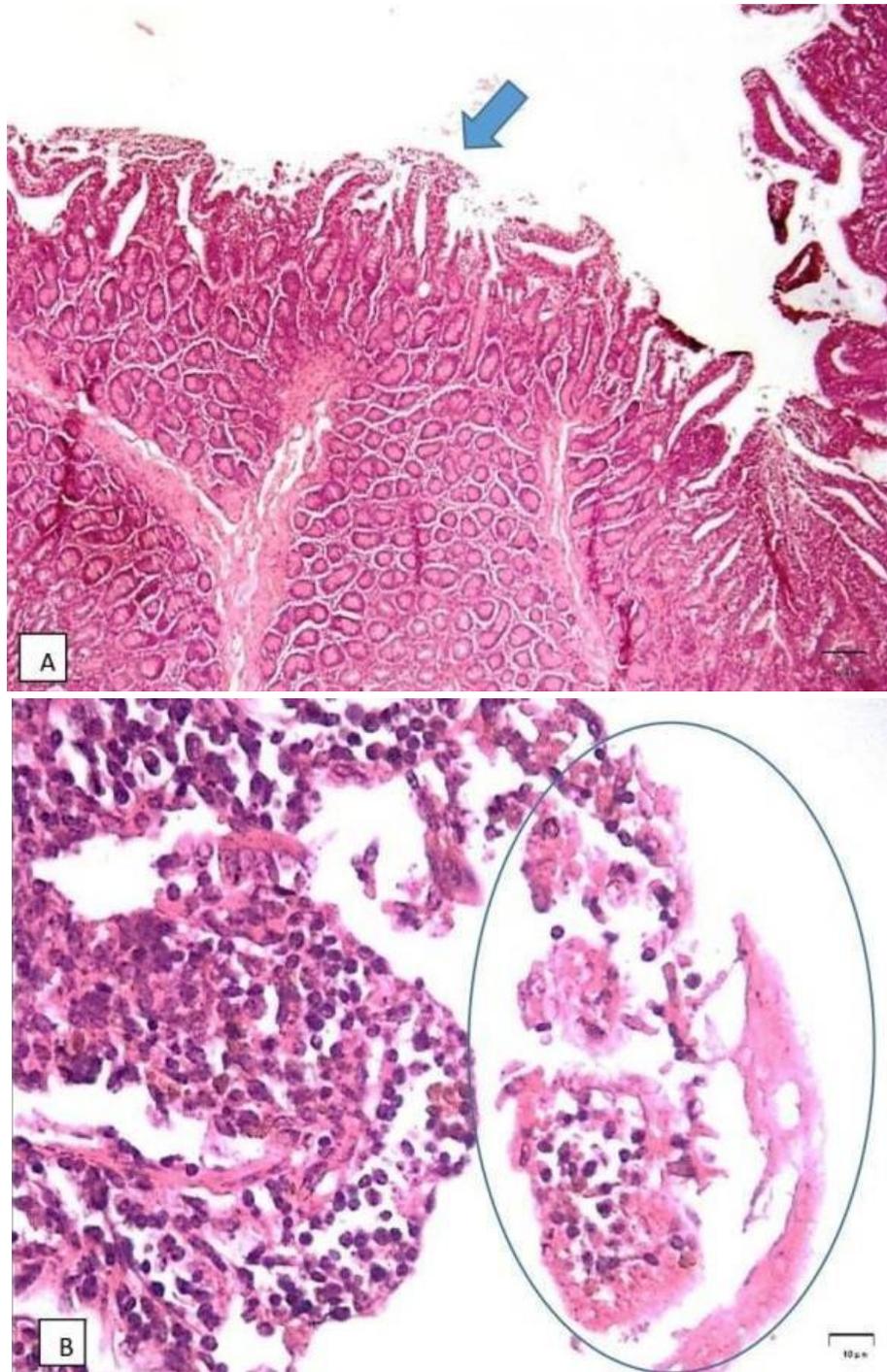
Tabela 4- Ranqueamento de lesões histológicas analisadas no quinto dia pós infecção das secções do duodeno e jejuno proximal de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36 mg/kg (Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84 mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).

Parâmetro/ local		Controle \pm SD	Gr 1 \pm SD	Gr 2 \pm SD	Gr 3 \pm SD	Gr4 \pm SD
Duodeno						
Resp. Infl.2 \pm 0			2 \pm 0,4	2 \pm 0,44	2 \pm 0,63	2 \pm 0,37
Aguda						
Hemorragia	1 \pm 0,53		1,5 \pm 0,54	2 \pm 0,44	1,5 \pm 0,54	2 \pm 0,69
Necrose	3 \pm 0,69		2,5 \pm 0,54	3 \pm 0,44	3 \pm 0,4	3 \pm 0,75
Jejuno proximal						
Resp. Inf.2 \pm 0			2 \pm 0	2 \pm 0,54	2 \pm 0,51	2 \pm 0,53
Aguda						
Hemorragia	1 \pm 0,48		1,5 \pm 0,81	1 \pm 0,89	2 \pm 0,63	2 \pm 0,69
Necrose	3 \pm 0,89		2,5 \pm 0,81	3 \pm 0,44	3 \pm 0,51	3 \pm 0,57

Resp. Infl. Aguda: Resposta Inflamatória Aguda

Tanto no segmento duodenal, quanto no jejuno proximal ocorreram poucas áreas de lesões com neutrófilos em lâmina própria, hemorragia leve e necrose superficial (Figura 14).

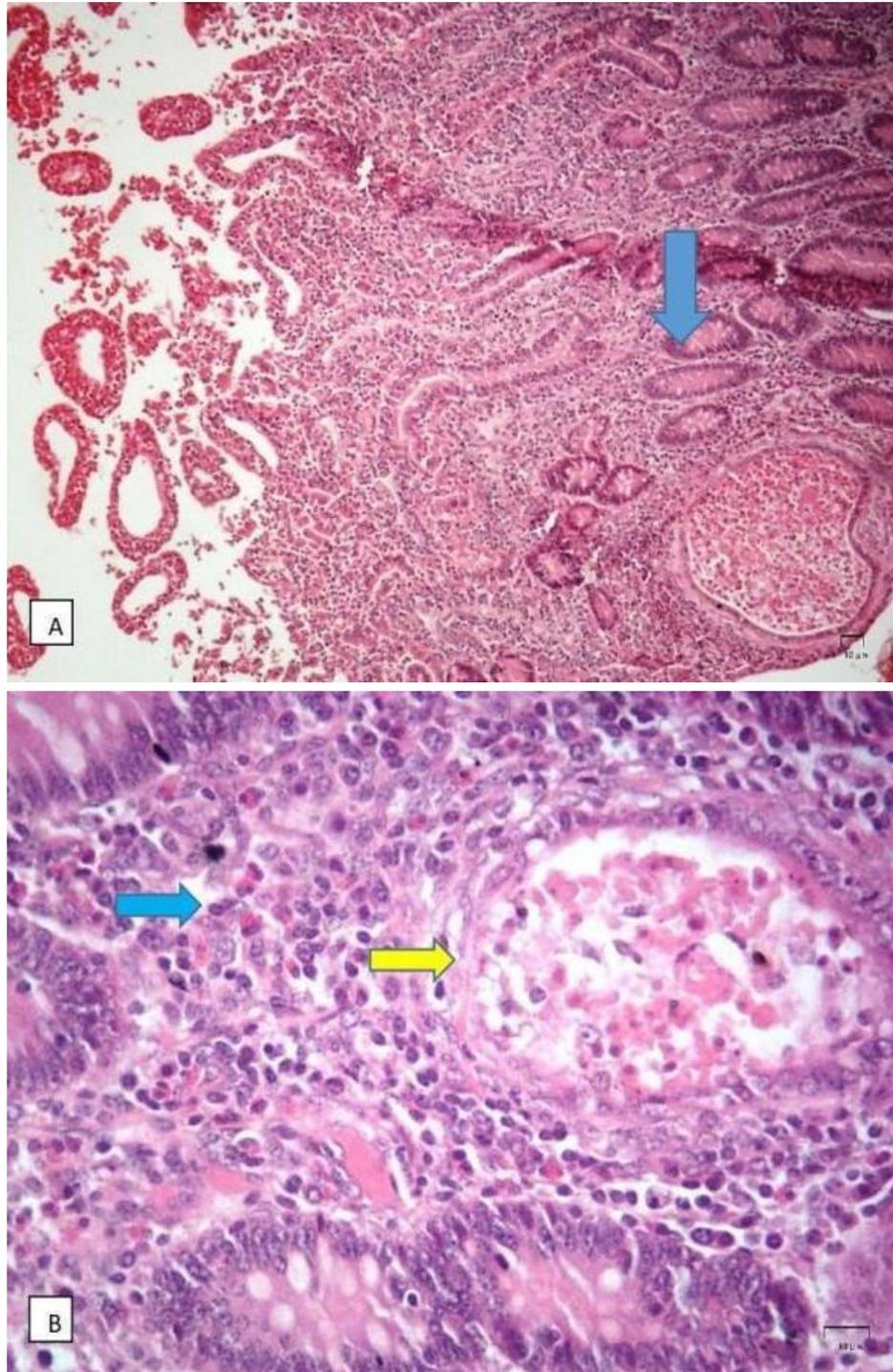
Figura 14 – Fotomicrografia representativa de lesão em mucosa duodenal.



A - necrose na extremidade superficial dos vilos (seta azul), com preservação da parte profunda e das criptas (10X). B – detalhe da necrose exibindo destruição do epitélio, detritos celulares, leucócitos e hemácias destacando-se para a luz intestinal (círculo azul), aumento 40X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nesses segmentos, nos distintos tratamentos, notou-se poucas áreas de lesões com neutrófilos em lâmina própria, hemorragia leve e necrose superficial. A ocorrência de lesões mais brandas nos segmentos iniciais do intestino se justificam pelo fato do principal sítio de ligação da STEC/EPEC ser o intestino delgado, com tropismo mais evidente para o segmento distal (Govindarajan et al., 2020). Isso ocorre por que a porção inicial do intestino delgado não fornece uma condição ideal para a aderência da *E. coli* à mucosa intestinal. A aderência bacteriana na superfície da mucosa é parte essencial para que ela exerça sua patogenicidade. Para tal, a EPEC possui fatores de colonização (FC) que são polímeros proteicos filamentosos, chamados fímbrias presentes na superfície bacteriana e que se ligam a receptores de carboidratos do epitélio (glicoproteínas e glicosíngolípides) através da sua porção final que contém adesina (Zhang et al., 2022). A STEC/EPEC liga-se a glicoproteínas e glicosíngolípides da membrana epitelial celular do intestino delgado com especial tropismo pelo epitélio relacionado a Placa de Peyer, ou seja, na porção distal do intestino (Zhang et al., 2022; Fitzhenry et al., 2022). Nessa região, as células da mucosa possuem receptores para moléculas de intiminas, Tir e fímbrias polares longas (Lpf) presentes em espécies de STEC, através dos quais as bactérias ligam-se às células M (Cordonnier et al., 2017; Fitzhenry et al., 2022; Hartland et al., 1999). Tal condição favorece tanto a adesão bacteriana, quanto sua apresentação aos macrófagos presentes na lâmina própria (Etienne-Mesmin et al., 2011). Nos segmentos intestinais jejuno medial, jejuno distal e íleo, observou-se lesões mais intensas onde já se começa notar diferença entre os tratamentos. A figura 15 representa a fotomicrografia do segmento jejunal médio, no qual pode-se visualizar uma resposta inflamatória aguda pela presença de células inflamatórias (neutrófilos) em lâmina própria, com coleção de células inflamatórias e debris celulares formando microabscessos de criptas.

Figura 15 – Fotomicrografia representativa de lesão em jejuno médio.



A - resposta inflamatória aguda com coleção de células inflamatórias e debris celulares formando microabscessos na luz da cripta (seta azul, 10X). B - detalhe do infiltrado inflamatório (seta azul) com linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos em lâmina própria e microabscessos (seta amarela) com debris celulares na luz da cripta (40X). Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Ao avaliar estatisticamente os dados do jejuno médio, os valores de hemorragianão apresentaram diferenças entre os tratamentos, contudo foram detectadas diferenças entre tratamentos para as variáveis resposta inflamatória aguda e intensidade de necrose (Tabela 5). A resposta inflamatória aguda do grupo 2 mostrou-se estatisticamente mais intensa que no grupo controle ($P < 0,05$), respectivamente ranqueadas em $3 \pm 0,54$ e 2 ± 0 . Salienta-se, aqui, que o único segmento intestinal que apresentou diferença nesse parâmetro foi o jejuno médio. Portanto é provável que se trate de um achado acidental. Todavia, não se pode descartar uma eventual ação da beta-glucana nesse aspecto. Isso se sustenta no fato da beta-glucana aumentar a atividade antimicrobiana das células mononucleares e neutrófilos, de aumentar a atividade funcional dos macrófagos, estimular a proliferação de monócitos e macrófagos e estimular a produção de moléculas pró-inflamatórias (Barton et al., 2016). Chama a atenção que a resposta inflamatória aguda no grupo controle foi homogênea, com desvio padrão de 0 (zero), fato que também ocorreu como o grupo controle nos segmentos duodeno e jejuno proximal (Tabela 4) e no íleo do grupo 1 (Tabela 7). Na maioria dos segmentos do grupo 1 e em todos os segmentos dos grupos 2, 3 e 4 o desvio padrão do parâmetro resposta inflamatória aguda apresentou maior variabilidade. Este comportamento nos remete a pensar que a ação da beta-glucana sobre o sistema imune pode sofrer alguma influência da variabilidade individual, haja vista que tanto as ações imunológicas quanto as vias de sinalizações induzidas pela beta-glucana ainda não foram totalmente elucidadas (Chan et al., 2009).

Tabela 5: Ranqueamento de lesões histológicas analisadas no quinto dia pós infecção da secção jejuno médio de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36 mg/kg (Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84 mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).

Jejuno médio	Controle \pm SD	Gr 1 \pm SD	Gr 2 \pm SD	Gr 3 \pm SD	Gr4 \pm SD
Resp.	2A \pm 0	2AB \pm 0,75	3B \pm 0,54	2,5AB \pm 0,54	2AB \pm 0,53
Infl.Aguda					
Hemorragia	2 \pm 0,48	2 \pm 0,75	1 \pm 0,54	2 \pm 0,75	2 \pm 0,81
Necrose	3A \pm 0,37	3A \pm 0,4	3A B \pm 0,83	4B \pm 0,4	4AB \pm 0,53

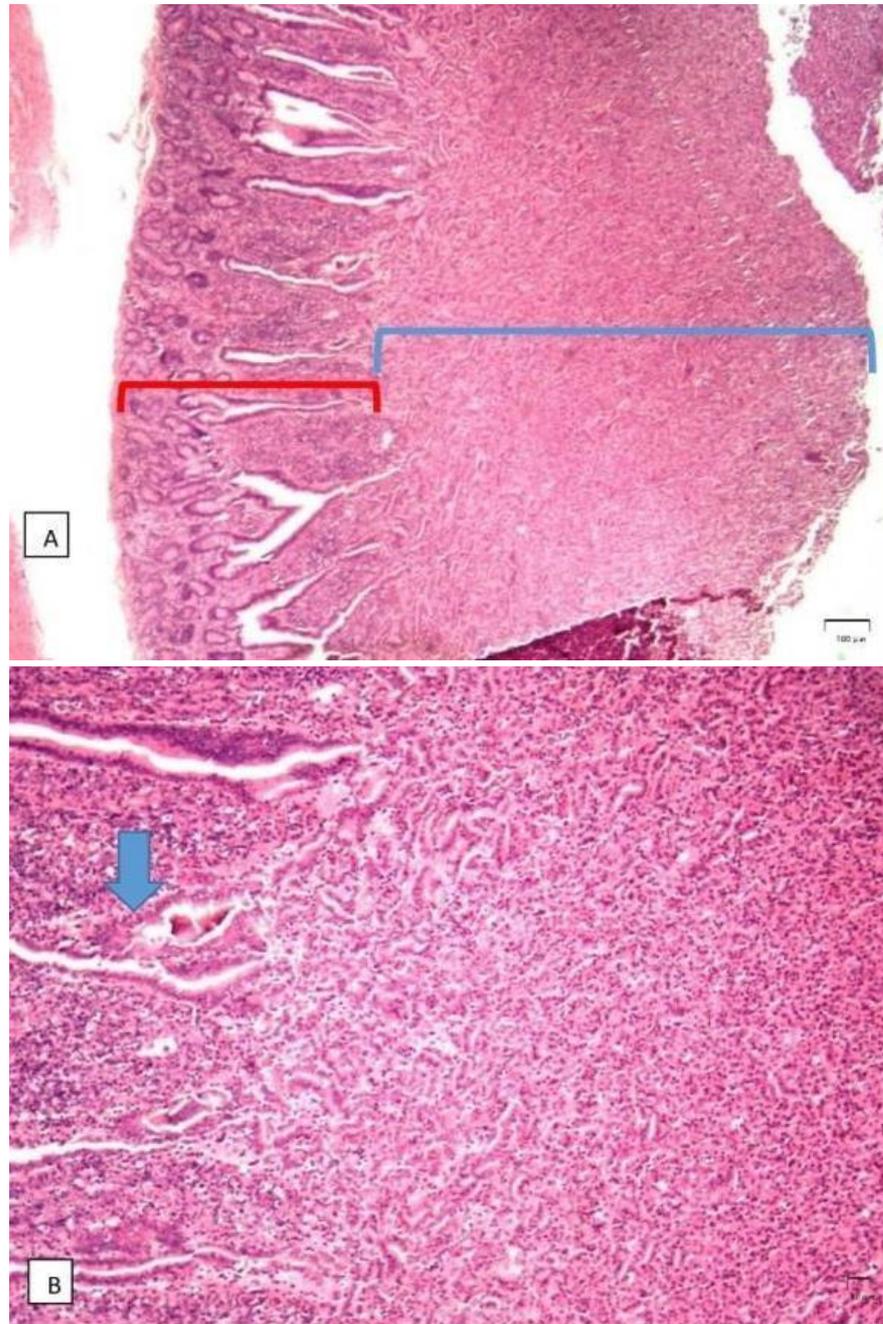
Letras distintas diferem entre si. $P < 0,05$. Resp. Infl. Aguda: Resposta Inflamatória Aguda

Necrose é a morte celular que se dá com o edema das organelas e ruptura da membrana citoplasmática com consequente liberação de moléculas que estimulam a resposta inflamatória. Ela acontece devido a uma injúria externa à célula geralmente associada a um processo inflamatório onde produtos da resposta inflamatória vão afetar a viabilidade celular e levá-la a morte. (Khalid et al., 2023). Na tabela 5 observa-se que o grupo 3 apresentou intensidade de necrose mais elevada $4 \pm 0,4$ ($P < 0,05$) que os grupos controle e 1, respectivamente com resultados de $3 \pm 0,37$ e $3 \pm 0,4$. Apesar de ser o único segmento intestinal onde se observa estatisticamente um aumento da intensidade de necrose no grupo 3 em relação aos demais, de uma forma geral, numericamente todos os tratamentos que receberam maiores doses de beta-glucana (*i.e.* grupos 3 e 4) tendem a apresentar intensidade de necrose numericamente maiores que o grupo 1, que se aproxima de um comportamento semelhante ao do grupo controle. Uma possível explicação para este padrão de resposta seria uma estimulação exacerbada da resposta imune inata frente ao desafio bacteriano. Esta hipótese se sustenta no fato de que a resposta imune inata faz parte da patogênese da infecção da *E. coli* do subtipo EHEC no intestino de bezerros experimentalmente infectados, pois através da própria resposta imune contra a presença da bactéria e

sua toxina acontecem as lesões epiteliais e não só apenas pela ação direta da bactéria ou da toxina (Larzabal et al., 2020).

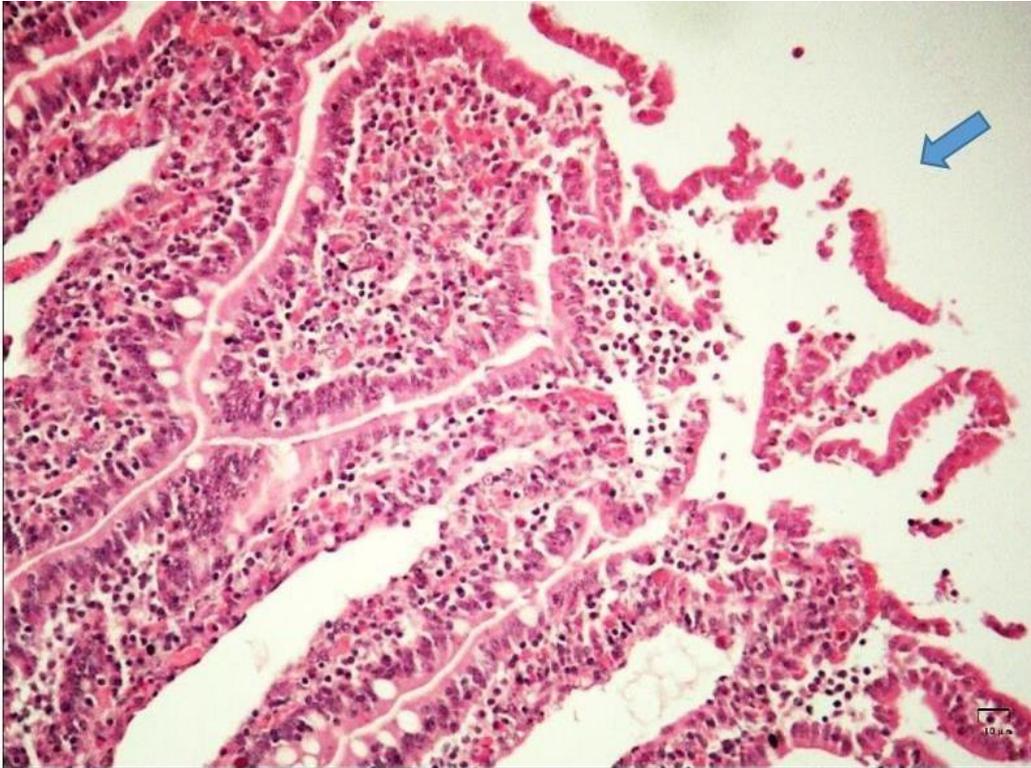
Na figura 16 pode-se observar uma fotomicrografia de jejuno médio representativa do grupo 3, o qual apresenta necrose frequentemente extensa e profunda, enquanto os grupos controle e 1 apresentam necrose estrita a porção mais superficial dos vilos (Figura 17).

Figura 16 – Fotomicrografia representativa de lesão em mucosa de jejuno médio.



A - necrose extensa profunda: perda da morfologia vilosa e disruptura da arquitetura até a profundidade (barra azul) restando o 1/3 inferior da mucosa (barra vermelha) (4X). B - Perda da morfologia das vilosidades, com debris celulares e células inflamatórias, aspecto morfológico da base das criptas preservado com presença de infiltrado inflamatório intenso (seta azul)(10X).Fonte: Elaborado pela autora (2024).

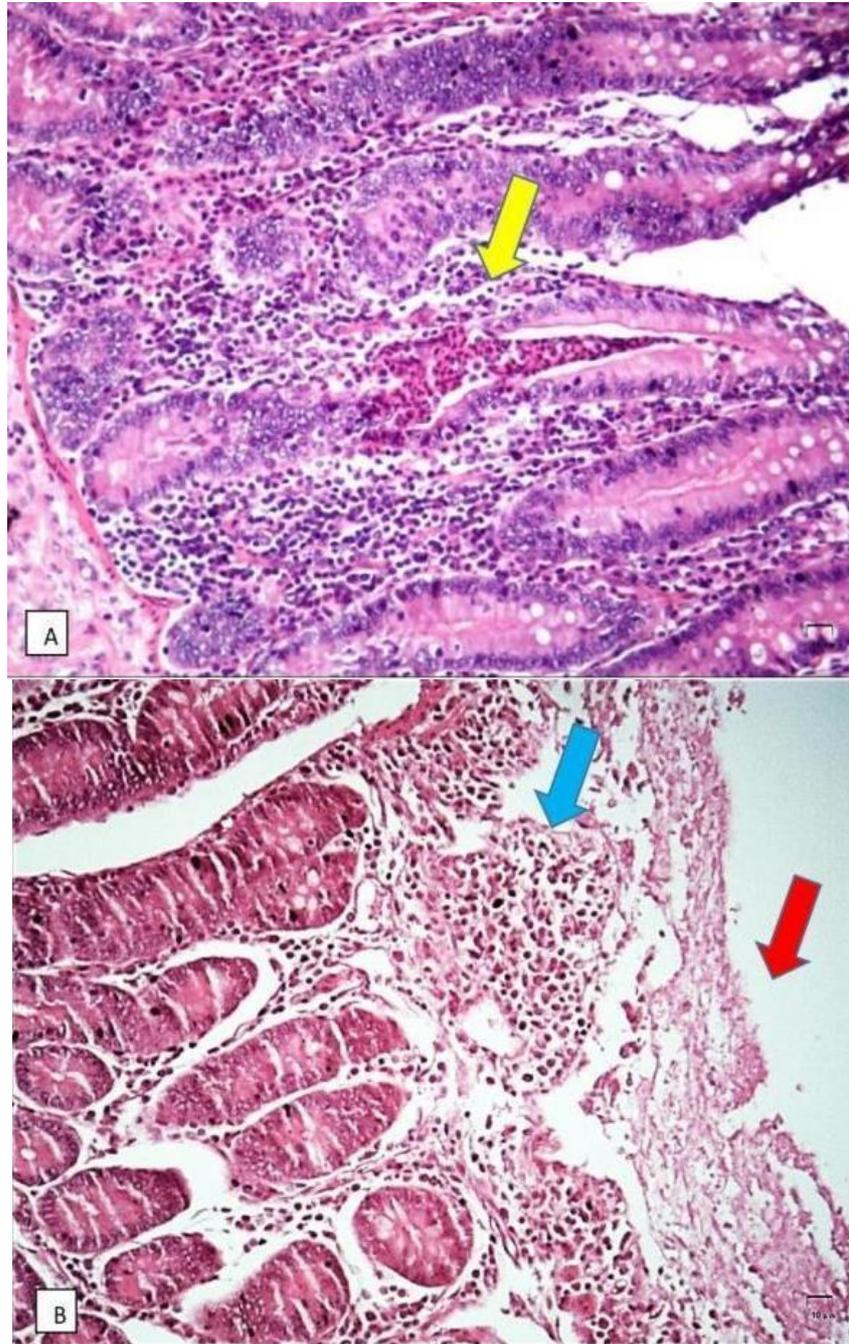
Figura 17 – Fotomicrografia representativa de lesão superficial em jejuno médio



Necrose focal superficial com discreta destruição e destacamento do epitélio da superfície vilosa (seta azul). Aumento 20X, coloração HE.
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A fotomicrografia 18A representa o Segmento jejunal distal, onde foram observados tanto animais apresentando tanto inflamatório agudo em lâmina própria com formação de microabscessos de criptas, quanto indivíduos apresentando lesões de necrose superficial e hemorragia franca (18B).

Figura 18 – Fotomicrografia representativa de lesão em jejuno distal.



A -resposta inflamatória aguda com coleção de neutrófilos formando microabscessos na luz das criptas (seta amarela). (20X). B –necrose superficial(seta azul) porém com hemorragia franca (seta vermelha). Aumento 20X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

No Segmento jejunal distal (Tabela 6) não se observou diferença entre os grupos no que diz respeito a resposta inflamatória aguda. Contudo, o grupo 2 apresentou a mediana de hemorragia menor ($P < 0,05$) que o grupo 4, respectivamente de $1 \pm 0,5$ e $3 \pm 0,95$. Por sua vez, a intensidade de necrose nesse segmento intestinal foi menos intensa no grupo 1 quando comparada com o grupo controle ($P < 0,05$), respectivamente com ranqueamento de intensidade de $3 \pm 1,03$ e de $3,5 \pm 0,54$.

Tabela 6: Ranqueamento de lesões histológicas analisadas no quinto dia pós infecção da secção jejuno distal de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36mg/kg(Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84 mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).

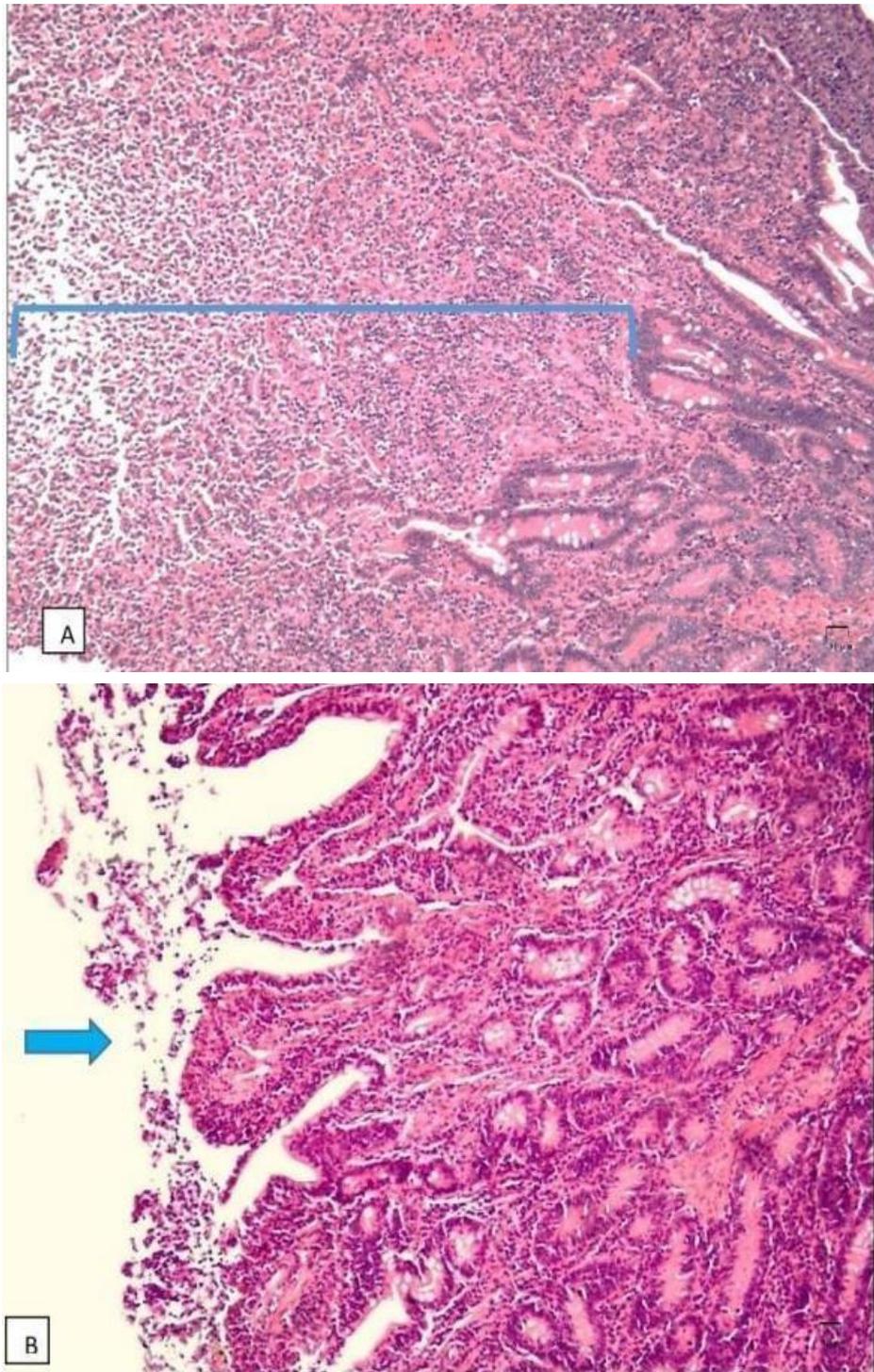
Jejuno distal	Controle \pm SD	Gr 1 \pm SD	Gr 2 \pm SD	Gr 3 \pm SD	Gr 4 \pm SD
Resp	2,5 \pm 1,54	3 \pm 0,89	2,5 \pm 0,57	2 \pm 0,54	3 \pm 0,48
InflAguda					
Hemorragia	2AB \pm 0,75	1AB \pm 0,54	1A \pm 0,5	2AB \pm 0,54	3B \pm 0,95
Necrose	3,5A \pm 0,54	3B \pm 1,03	3AB \pm 0,81	3AB \pm 0,44	3AB \pm 0,69

Letras distintas diferem entre si. $P < 0,05$. Resp. Infl. Aguda: Resposta Inflamatória Aguda

O maior valor da mediana de hemorragia apresentado pelo grupo 4 pode ser explicado pela ação da beta-glucana sobre macrófagos, estimulando a produção de óxido nítrico sintetase que aumenta a formação de óxido nítrico (Novak et al., 2008). O óxido nítrico é um potente vasodilatador venoso, diminuindo a resistência venosa e tem efeito antiagregador plaquetário (Jin et al., 2010). Estes fatos em um contexto inflamatório/infeccioso superestimulado poderiam provocar um maior extravasamento de hemácias dos vasos sanguíneos. Corroborando com esta argumentação, o índice de hemorragia dos grupos 3 e 4, em todos os segmentos do intestino delgado, se apresentaram numericamente maiores que os grupos controle, 1 e 2.

A figura 19A representa um corte histológico do grupo controle apresentando necrose extensa profunda, enquanto que a figura 19B representa um corte histológico do grupo G1, apresentando necrose extensa superficial.

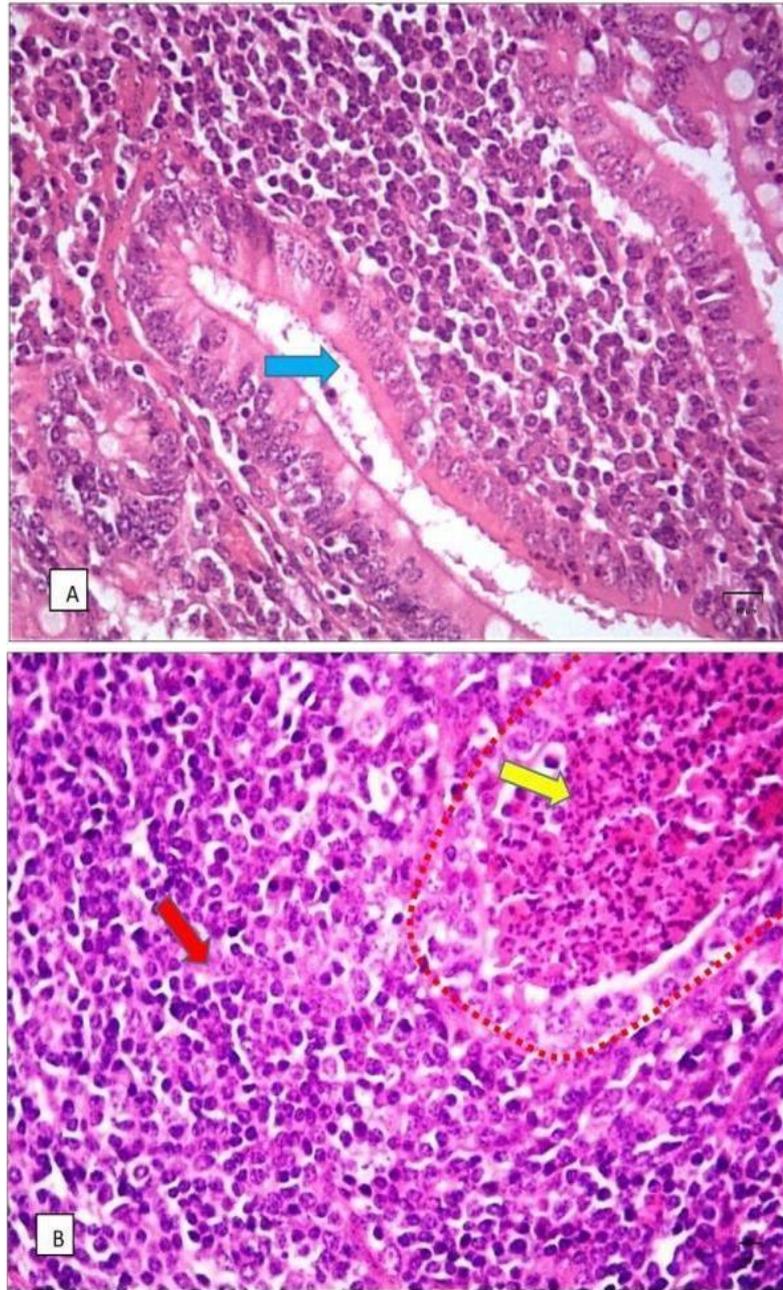
Figura 19 – Fotomicrografia representativa de lesão em jejuno distal



A -Destruição tecidual e disruptura da arquitetura vilosa caracterizando necrose extensa profunda (barra azul) (10X). B – Destruição do epitélio da superfície caracterizando uma necrose extensa superficial (seta azul). Aumento 20X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Por sua vez, a figura 20 representa uma área de transição entre o jejuno distal e o início do íleo, onde são evidenciadas células M em um epitélio sobrejacente a um folículo linfoide da Placa de Peyer (figura 20A). Na figura 20B destaca-se um microabscesso de na cripta no qual identifica-se destruição parcial do epitélio logo acima de um folículo linfóide.

Figura 20– Fotomicrografia representativa de uma área de transição entre jejuno e íleo.



A - Estrutura do epitélio sobrejacente aos folículos linfóides da Placa de Peyer, contendo as células M (seta azul), pelas quais tanto a beta-glucana quanto a *E.coli* possuem afinidade (40X).
B - Formação de microabscesso (seta amarela) na cripta com destruição parcial do epitélio (contorno vermelho) logo acima de um folículo linfóide (seta vermelha), aumento 40X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O segmento distal do intestino delgado é o principal local de ligação da *E.coli* ao epitélio (Fitzhenry et al., 2022; Zhang et al., 2022) bem como da beta glucana (NOVAK et al., 2008), ambos com afinidade pelas células M epiteliais as quais morfologicamente estão dispostas sobre o tecido linfóide da Placa de Peyer. Essa condição pode ter favorecido a identificação do efeito da beta-glucana mitigando a intensidade da necrose do grupo 1 em relação ao grupo controle tanto no jejuno distal quanto no íleo (discutido adiante). Comumente, a intensidade da enterocolite necrosante decorrente da ação da *E. coli* é consequência de somatório de fatores vetoriais com forças opostas, os quais se destacam na capacidade imune do hospedeiro e na capacidade da bactéria em se aderir à superfície da mucosa, invadir e lesar as células do hospedeiro e de se multiplicar (Kaper et al., 2004; Zhang et al., 2022).

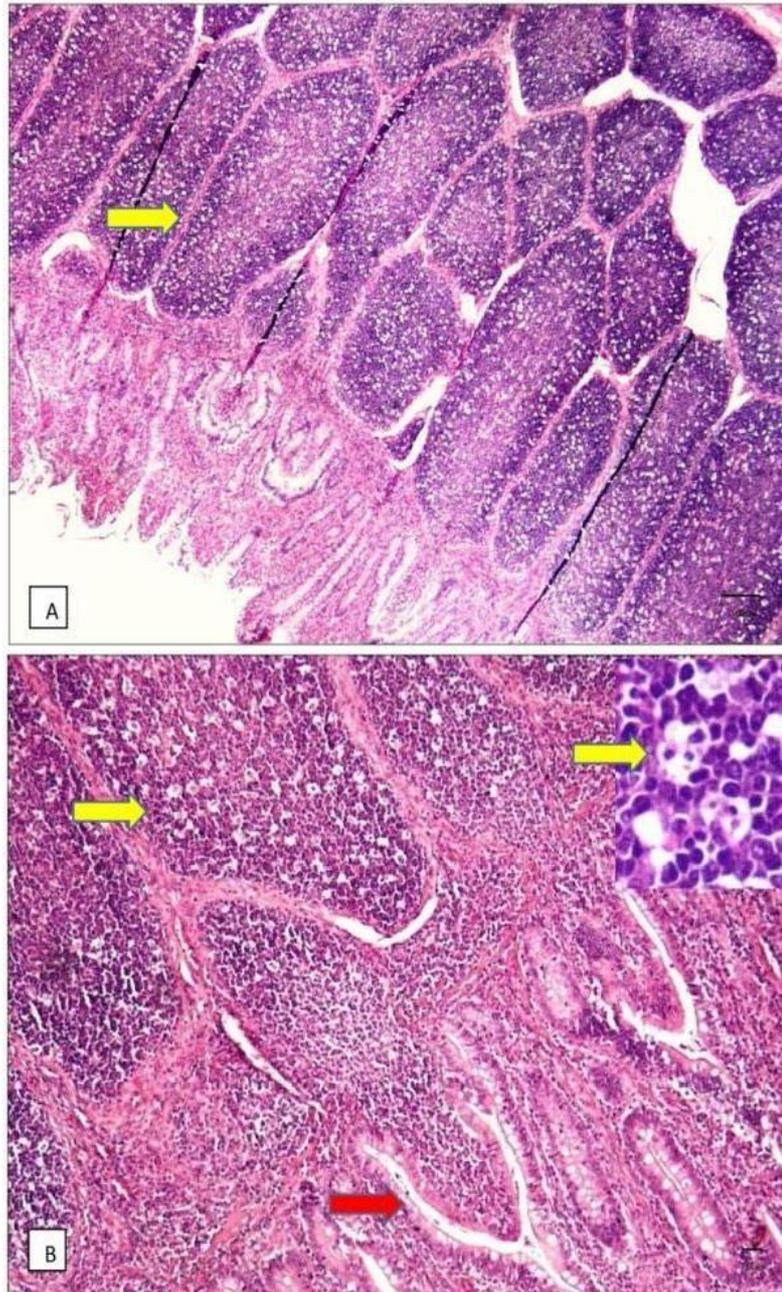
De fato, a beta-glucana pode se ligar tanto a toxinas, quanto a bactérias patogênicas mitigando, assim, um efeito deletério para o hospedeiro (Takaloo et al., 2023). Todavia este efeito mecânico produzido pela beta-glucana não parece ser o principal mecanismo que favoreceu a redução da intensidade da necrose no grupo 1, haja vista que os grupos 2, 3 e 4 receberam doses superiores, chegando a uma concentração de beta-glucana sete vezes superior. Por outro lado, a beta-glucana possui uma conhecida capacidade imunomodulatória que pode explicar a redução da intensidade de necrose identificadas tanto no jejuno distal, quanto no íleo. Apesar dessa ação sobre o sistema imune não ser totalmente elucidada, ele ocorre mediada pela interação do biopolímero em diferentes intensidades com os receptores celulares Dectin-1; CR3; TLR2 e 4; e lactosilceramida 2 e 6 (Sonck et al., 2010). Em um contexto geral, a beta-glucana ativa e aumenta a atividade antimicrobiana das células mononucleares e neutrófilos, aumentam a atividade funcional dos macrófagos, estimulam a proliferação de monócitos e macrófagos e estimulam a produção de moléculas pró-inflamatórias, como por exemplo componentes do complemento, interleucina (IL)-1 α/β , TNF- α , IL-2, interferon (IFN)- γ , eicosanóides, IL-4 e IL-10 (BARTON et al., 2016).

Os estímulos supracitados da beta-glucana sobre o sistema imune são importantes para compreender os mecanismos pelos quais o grupo 1 apresentou menor intensidade de necrose. Isso, porque, os níveis aumentados de citocinas pró-

inflamatórias estão associados à resolução mais rápida das infecções por *E. coli* (Long et al., 2010). Em adição, imunidade treinada induzida pela beta- glucana, pode promover uma ativação global dos macrófagos ao invés de uma simples diferenciação em M1 e M2 (Bhattarai et al, 2022). Por sua vez, o processo de ativação das células fagocitárias consiste em vários processos interligados, incluindo aumento da quimioquímica, quimiotaxia, migração de macrófagos e neutrófilos para partículas a serem fagocitadas, degranulação levando ao aumento da expressão de moléculas ligantes na superfície, adesão ao endotélio e migração de macrófagos para os tecidos (Novak and Vetvicka, 2008). Nesse caso, é importante destacar que o recrutamento e a presença de neutrófilos e células macrófagos fazem parte da resposta imune inata e são mandatórios para eliminar uma infecção intestinal (Wéra et al., 2016), e o acúmulo de neutrófilos na luz das criptas intestinais forma os microabscessos. Normalmente estes microabscessos neutrofílicos intestinais estão associados a atividade da resposta inflamatória contra um patógeno, no caso de infecção bacteriana (Talmon et al., 2017). Por sua vez, a presença de neutrófilos no lúmen das criptas foi descrita no contexto da resposta inflamatória aguda em bezerros infectados por *E.coli* produtora de shigatoxina (Larzabal et al., 2020). Assim, é interessante observar que ao longo do trato gastrointestinal houve um aumento na frequência de ocorrência tanto de microabscessos neutrofílicos que formam coleções de neutrófilos na luz das criptas, como também aqueles chamados de microabscessos apoptóticos que possuem restos de células epiteliais apoptóticas (figuras 18 e 20). Destaca-se visualmente, que os animais que receberam beta-glucana apresentaram uma maior frequência de microabscessos. Especificamente o parâmetro de microabscessos será discutido adiante.

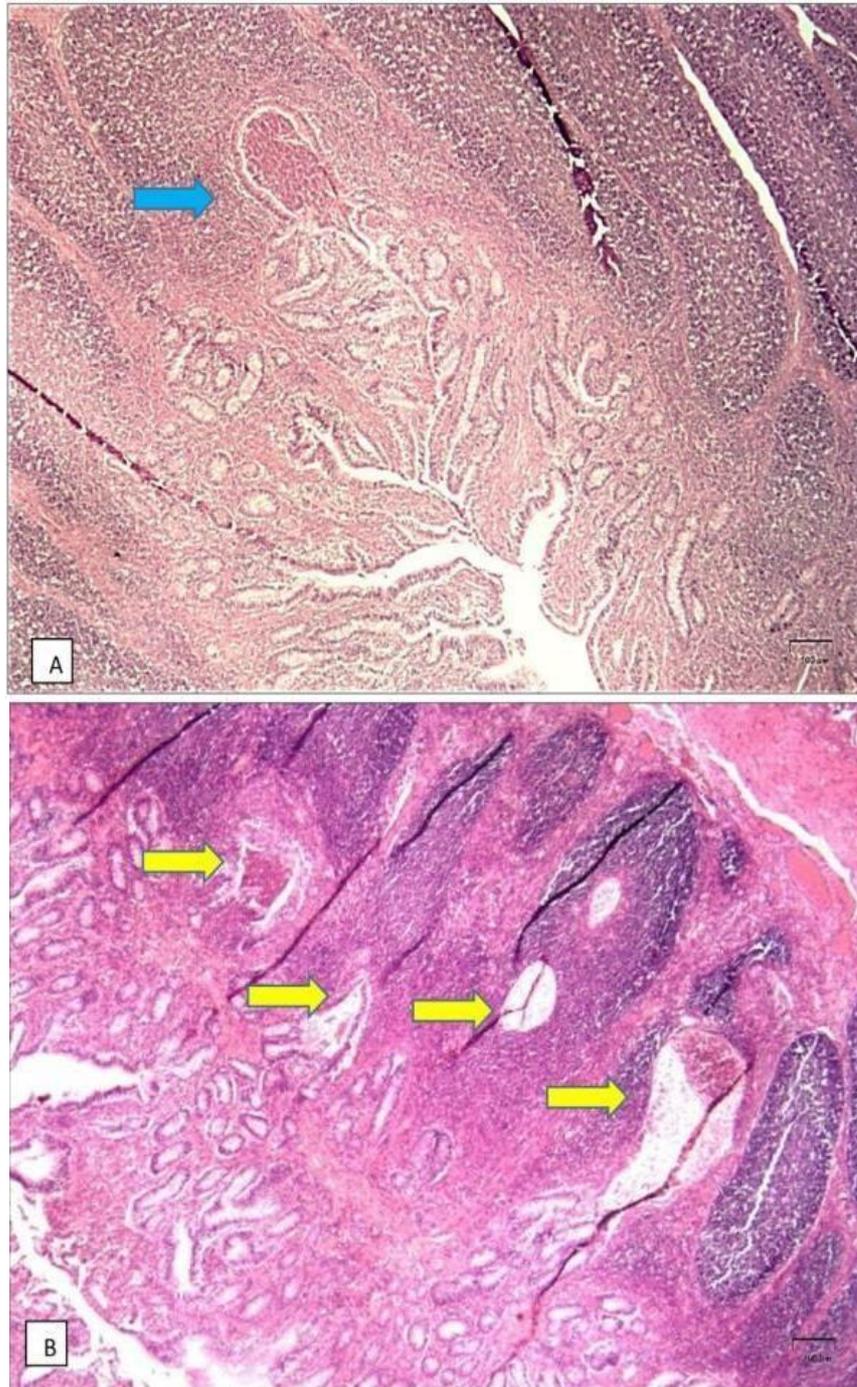
O segmento Íleo é o segmento do intestino delgado onde se encontra a Placa de Peyer, que é uma grande formação de agregados de folículos linfóides em íntimo contato com as células epiteliais da mucosa intestinal (Figura 21 e 22).

Figura 21 – Fotomicrografia representativa da Placa de Peyer em íleo.



A - grandes folículos linfóides agregados (seta amarela) em estreito contato com o epitélio sobrejacente (4X). B - folículos linfóides com centros germinativos reativos exibindo uma grande quantidade de macrófagos (setas amarelas) com corpos tingíveis (debris celulares fagocitados, mostrado no detalhe superior a direita) e estrutura algo triangular contendo as células M (seta vermelha). Aumento 20X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 22 – Fotomicrografia representativa de microabscessos em Placa de Peyer



A – Cripta com coleção de neutrófilos e debris celulares formando microabscessos (seta azul) projetando-se para dentro da Placa de Peyer (4X). B –Diversos microabscessos (setas amarelas) com debris celulares nas luzes das criptas estendendo-se aos folículos linfóides. Aumento 4X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O padrão de ranqueamento de lesões do íleo (Tabela 7) se assemelha ao jejuno distal, diferindo apenas na intensidade de hemorragia, onde os grupos 1 e 2 (valor de 1 ± 0 para ambos) apresentaram hemorragias menos intensas ($P < 0,05$) que os grupos 3 e 4 (valores respectivos de $2 \pm 0,51$ e $1,5 \pm 0,81$). Por sua vez, no parâmetro de necrose o grupo controle ($3 \pm 0,37$) continuou apresentando mais intensa que o grupo 1 ($2 \pm 0,44$) ($P < 0,05$), contudo nesse segmento, o grupo 4 ($2,5 \pm 0,54$) também diferiu do controle ($P < 0,05$). Os mecanismos pelos quais a beta-glucana pode reduzir a intensidade de necrose foram discutidos segmento jejuno distal.

Tabela 7: Ranqueamento de lesões histológicas analisadas no quinto dia pós infecção da secção ileal de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36 mg/kg (Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84 mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10¹⁰ UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).

Ileo	Controle \pm SD	Gr 1 \pm SD	Gr 2 \pm SD	Gr 3 \pm SD	Gr 4 \pm SD
Resp	Inf1 \pm 1	3 \pm 0	3 \pm 0,5	3 \pm 0,4	3 \pm 0,51
Aguda					
Hemorragia	1A \pm 0,37	1A \pm 0	1A \pm 0	2B \pm 0,51	1,5B \pm 0,81
Necrose	3A \pm 0,37	2B \pm 0,44	2,5AB \pm 0,95	3AB \pm 0,75	2,5B \pm 0,54

Letras distintas diferem entre si com $P < 0,05$.

Conforme já abordado, se por um lado a beta-glucana pode induzir a produção de óxido nítrico e ação antiplaquetária potencializando o extravasamento de hemácias dos vasos sanguíneos (Jin et al., 2010), por outro a beta-glucana também apresenta um efeito anti-inflamatório. Em cultura de células a beta-glucana foi capaz de modular negativamente a produção de citocinas inflamatórias como por exemplo o óxido nítrico, TNF- α e IL6 em macrófagos estimulados com LPS (Jo et al., 2010). Baseado na co-incubação de macrófagos ativados com beta-glucana de ligações (1-3)(1-6), fosforilação de p38 MAPK foi inibida, com isso, a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL8, IL2 e IL12 foram diminuídas (WANG et al., 2014). *In vivo*, o efeito anti-inflamatório e analgésico da beta-glucana foi testado em ratos provocado pelo modelo de injeção de ácido acético intraperitoneal. Observou-

se marcada redução, dose dependente, dos parâmetros inflamatórios e analgésicos de $82\pm 6\%$ com a dose média de 1,19mg/kg e de $85,5\pm 5\%$ com dose de 3mg/kg, demonstrando, assim, potente ação anti-inflamatória e analgésica (Smiderle et al., 2008). Também *in vivo*, porém com modelo de peritonite murino, demonstrou-se que a beta-glucana apresentou capacidade de diminuir as citocinas IL1 e INF-g em lavado peritoneal, permitindo uma atribuição farmacológica de atividade antiinflamatória à beta-glucana (Queiroz et al., 2010). Já em modelo de doença inflamatória intestinal, Nishitani e colaboradores (2013) demonstram atividade anti-inflamatória da beta-glucana, com marcada diminuição da expressão do receptor de TNF- α (TNFR1) e consequente inibição da via do NF- κ B e diminuição da expressão do gene de IL8. Apesar de não estar muito claro o efeito pró-inflamatório/anti-inflamatório durante a infecção por *E. coli*, os dados encontrados até o momento sugerem que o equilíbrio pró- inflamatório/anti-inflamatório possa ser influenciado pela dose de beta-glucana. Corrobora com esta hipótese o fato da beta-glucana promover grande atividade pró eanti-inflamatória em macrófagos treinados, nesse caso, a reprogramação do fenótipo dos macrófagos pode ser dependente de receptores TLR4 (Bhattarai et al, 2022).

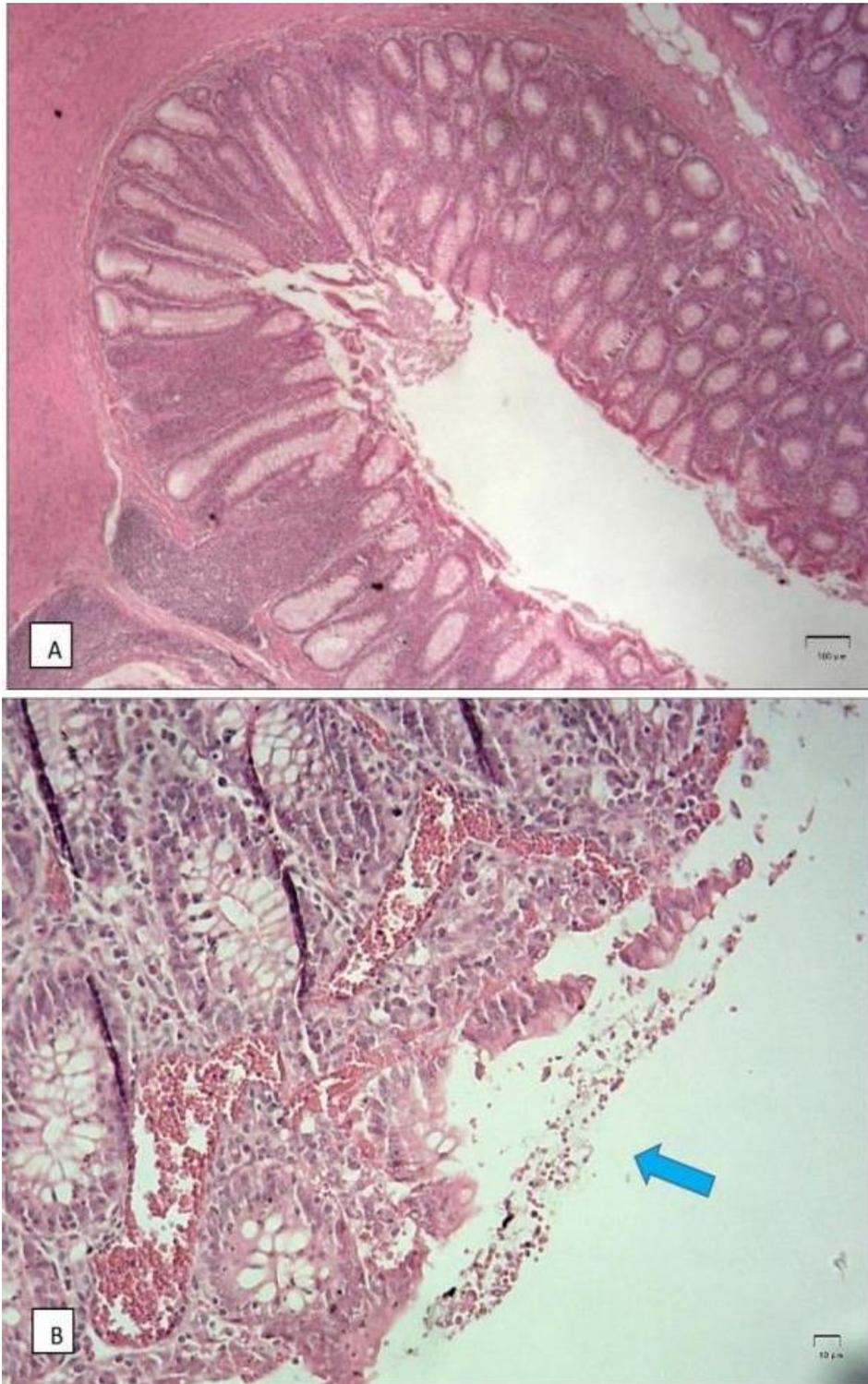
Não foi identificada nenhuma diferença entre os tratamentos nos parâmetros do ceco e do cólon (Tabela 8). Apesar de não ter sido identificada diferença estatística é importante relatar que nenhum animal do grupo controle apresentou alterações histológicas compatíveis com regeneração tecidual no ceco ou cólon. Por outro lado, todos os tratamentos que receberam beta-glucana apresentaram pelo menos um animal com alterações compatíveis com regeneração tecidual nesses segmentos, com destaque para os grupos 2 e 4 que apresentaram dois animais cada com estas alterações.

Tabela 8: Ranqueamento de lesões histológicas analisadas no quinto dia pós infecção das secções ceco e cólon de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36 mg/kg (Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84 mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).

Parâmetros/loc	Controle \pm SD	Gr 1 \pm SD	Gr 2 \pm SD	Gr 3 \pm SD	Gr4 \pm SD
Ceco					
Resp Infl. Aguda	2 \pm 0,95	2 \pm 0,63	2 \pm 0,57	2 \pm 0,4	2 \pm 1,38
Hemorragia	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0
Necrose	1 \pm 0,37	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0,53
Cólon distal					
Resp Infl. Aguda	2 \pm 0,89	2,5 \pm 0,81	3 \pm 0,83	4 \pm 0,89	2 \pm 1,1
Hemorragia	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0
Necrose	1 \pm 0,48	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0,37

As alterações histológicas observadas em ambos os segmentos foram discretas e com maior frequência representada principalmente pelos neutrófilos em lâmina própria com poucos microabscessos e erosões (Figura 23). Estas lesões mais discretas são compatíveis com a ação da infecção por *E. coli* (STEC/ETEC) utilizada no experimento. Isso, porque, apesar do ceco e do cólon não serem a região de maior tropismo da bactéria utilizada no experimento, a *E. coli* pode colonizar e causar lesões no ceco e do cólon de bezerros (Larzabal et al., 2020).

Figura 23 – Fotomicrografia representativa de lesões em cólon.

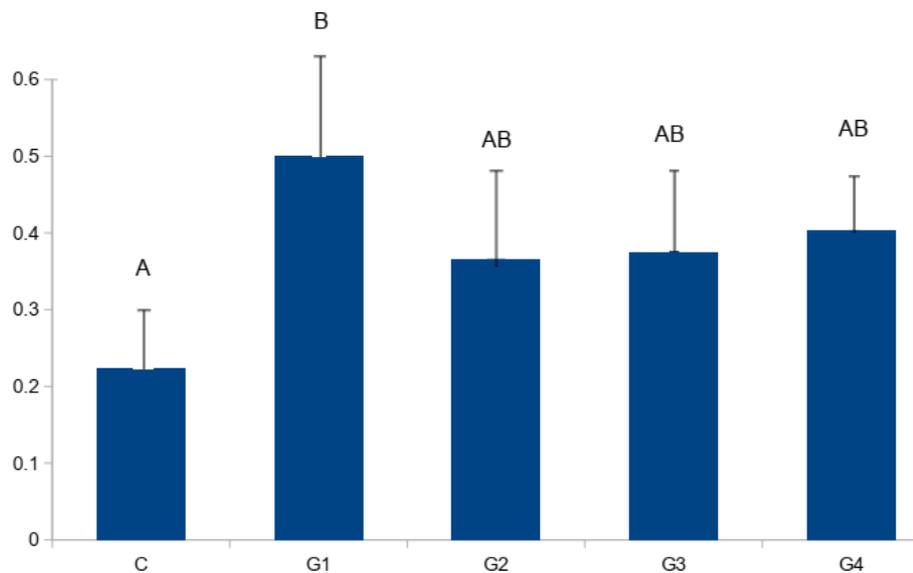


A – Resposta inflamatória restrita a mucosa com neutrófilos na lâmina própria e necrose focal (4X). B – Infiltrado inflamatório com linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos em lâmina própria com necrose focal (seta azul). Aumento 20X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A presença de microabscessos foi avaliada em todos os segmentos do sistema digestivo conjuntamente. Na figura 24, observa-se que a probabilidade de ocorrência de microabscessos no grupo 1 é significativamente maior que o grupo controle. Adicionalmente todos animais que receberam beta-glucana apresentaram resultado de valores numéricos maiores que o grupo controle nessa variável. Cabe destacar que o grupo 4 foi borderline em relação à detecção de diferença estatística ao grupo controle ($P=0,0509$).

Figura 24: Probabilidade de ocorrência de microabscessos em amostras ao longo do Intestino delgado de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36

mg/kg (Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84 mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC). Letras distintas diferem entre si com $P<0,05$ pelo teste de Dunn's com proteção de Bonferroni.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A formação de abscessos e microabscessos muitas vezes são associadas com o processo de cronificação de uma doença. Contudo, nem sempre a formação dessas estruturas apresentam consequências imediatas clinicamente negativas, isso por que, os abscessos/microabscessos apresentam um papel relevante no controle de infecções por *E. coli* e muitas vezes passam despercebidos nas avaliações clínicas (Hullahalli et al., 2023). Segundo os autores a presença de grande quantidade de microabscessos em um processo infeccioso pode ser benéfica, haja vista que a grandes quantidades de células imunes que criam um abscesso podem aumentar a

imunidade adaptativa à infecção, o que sugere que, desde que os abscessos sejam eventualmente eliminados, eles podem ter efeitos positivos para o hospedeiro. Ao longo do sistema digestivo ocorrem dois tipos de microabscessos de cripta, o microabscessos de cripta neutrofílico e o apoptótico. Especificamente no caso dos abscessos de criptas neutrofílicas, traduzido por uma coleção de neutrófilos respondendo contra um processo inflamatório ativo, como por exemplo uma infecção bacteriana. (Talmon et al., 2017).

Considerando a gênese dos microabscessos, quando a *E. coli* entra em contato com células do sistema imune, sinaliza via receptor TLR4 para promover o influxo de células imunes inatas (Hullahalli et al., 2023). Isso, porque, o receptor TLR4 que é um PRR (receptor de reconhecimento de padrão), e tem ação importante na resposta imune, principalmente no recrutamento de neutrófilos (Zaatout et al., 2022). Os neutrófilos são as primeiras células da imunidade inata a serem recrutadas frente a uma infecção e sua presença é imprescindível para eliminar um patógeno (Wéra et al., 2016). No caso de infecções entéricas, sua função é extinguir microorganismos que estejam na luz intestinal ou que atravessem a barreira epitelial e invadam a mucosa (Honda et al., 2018). Em infecções experimentais de camundongos por *E. coli*, o estímulo do TLR4 é determinante para a formação de abscessos e, camundongos knockout para o gene TLR4 não sobrevivem à infecção bacteriana (Hullahalli et al., 2023). De uma forma geral, os receptores TLR4 são importantes para a formação de abscessos em modelos murinos, contudo o estímulo de outros receptores de reconhecimento de padrões (e.g. TLR2) também participam no controle da infecção por *E. coli* e na formação de abscessos durante a infecção *in vivo* por *E. coli* (Ferraz et al., 2011; Hullahalli et al., 2023).

As primeiras reações imunes inatas no intestino infectado são críticas na patogênese da infecção por *E. coli* em bovinos. Em bezerros o receptor TLR4 também apresenta papel relevante no processo de infecção intestinal por *E. coli* (Larzabal et al., 2020). Segundo os autores, animais que permaneceram mais tempo positivos para isolamento de EHEC O157:H7 apresentaram redução da expressão genica de TLR4 no íleo e no cólon. Em adição, bezerros experimentalmente infectados com EHEC O157:H7 apresentam robusta presença de microabscessos neutrofílicos em resposta à infecção (Coura et al., 2014; Larzabal et al., 2020). Dentro deste contexto, considerando que a atividade imunomoduladora da beta-glucana é determinada pela

co-ativação extracelular dos receptores dectina-1, TLR2, TLR4 e TLR5 (Kanjian et. al, 2017), e que de acordo os autores, ao estimular os TLR2 e TLR4, a beta-glucana particulada também ativa importantes vias regulatórias imunológicas e modula a expressão genica do fator nuclear kappa B (NF-κB). Assim, é razoável assumir o uso da beta-glucana explique a maior probabilidade de ocorrência de microabscesso do grupo 1 em relação ao grupo controle.

A intensidade e a extensão das lesões necróticas apresentam uma relação direta com prognóstico e a velocidade de cura da diarreia em bezerros. Assim, para estimar a extensão e a intensidade das lesões necróticas ao longo do intestino, foi utilizado o índice de necrose intestinal (INI). O INI de cada unidade experimental foi conseguido pelo somatório do ranqueamento da intensidade da lesão de necrose de cada segmento do intestino avaliado. Em paralelo, para uma avaliação mais ampla, para cada unidade experimental também foi estimado o índice de saúde intestinal (ISI), o qual foi gerado pelo somatório dos parâmetros de todas as variáveis avaliadas. Para ambas as variáveis, quanto menor o valor obtido pelo INI ou ISI, melhor será a condição de saúde do intestino do bezerro. Os valores médios de INI e ISI podem ser visualizados na tabela 9.

Tabela 9 - Índice de necrose intestinal (INI) total e índice de saúde intestinal (ISI) de bezerros tratados com beta-glucana por 28 dias nas concentrações diárias de 0 mg/kg (Controle); 12 mg/kg (Grupo 1); 36 mg/kg (Grupo 2); 60 mg/kg (Grupo 3); e 84mg/kg (Grupo 4) e desafiados experimentalmente com inóculo contendo 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).

Índice	Controle ± SD	Gr1±SD	Gr 2±SD	Gr 3±SD	Gr 4±SD
INI	17,5 ±2,31A	14,5±1,05B	16±2,58AB	18±1,52A	18±1,72A
ISI	16,5±2,49A	13 ±1,67B	15±2,3AB	16,4±1,94A	17±2,42A

Letras distintas diferem entre si com $P < 0,05$.

Tanto para o INI, quanto para o ISI, o Grupo 1 mostrou-se significativamente menor que os grupos controle, Grupo 3 e Grupo 4 ($P < 0,05$). Avaliados de forma conjunta, o comportamento de ambos os índices, indicam que a administração diária de beta-glucana na dosagem de 12 mg/kg por um período de 28 dias (Grupo 1) reduzos efeitos negativos da infecção intestinal provocada pela *E. coli*. Apesar de não ter realizado

um estudo dose-resposta com leitões, Zhou e colaboradores (2016) demonstraram que a beta-glucana diminui o dano intestinal causado pela ETEC e melhora a performance do crescimento e da saúde intestinal.

Baseado na extensa revisão de literatura supra citada, os melhores índices de INI e ISI do grupo 1 em relação aos demais pode ser explicado por um incremento na capacidade de resposta do sistema imune dos bezerros grupo 1. Por outro lado, o aumento da dose de beta-glucana (G3 e G4) resultou em pioras nos parâmetros avaliados em relação ao grupo 1, remetendo a um comportamento dose-resposta do tipo gráfico em formato de parábola. Esse aumento das lesões em função dos aumentos da dose de beta-glucana nos tratamentos G3 e G4 pode ser fruto de um somatório de vetores, em especial o vetor ação bacteriana sobre o tecido animal e do vetor resposta exacerbada do sistema imune frente a ação da bactéria que pode gerar lesão tecidual.

O mecanismo pelo qual maiores doses de beta-glucana reduzem o INI e ISI são difíceis de serem explicados, mas como previamente reportado, a beta-glucana pode promover grande atividade pró e antiinflamatória em células do sistema imune e, o fenótipo dessas células parece ser dependente do tipo e da intensidade de estímulo que os receptores do sistema imune recebem. Interessantemente, macrófagos podem adquirir um tipo de memória imune inata, conhecida como imunidade treinada que é caracterizada por não ser antígeno-específica e por uma resposta intensa de citocinas a diversos estímulos patológicos. Além disso a imunidade treinada induzida por beta-glucana, pode promover uma ativação global dos macrófagos ao invés de uma simples diferenciação em M1 e M2 (Bhattarai et al., 2022).

A interação da beta-glucana com os receptores Dectina-1, TLR2, TLR4 e TLR5 estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias por células fagocitárias, como exemplo componentes do complemento, IL-1 α/β , TNF- α , IL-2, IFN- γ e eicosanóides, bem como IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 (Kanjana et al., 2017; Vannucci et al., 2013). De forma complementar, existe uma ação sinérgica entre o principal receptor de beta-glucana a Dectina-1 e o receptor TLR4, com um efeito regulatório em células dendríticas aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-23, IL-4, IL-6 e TNF- α (Sahasrabudhe et al., 2016). O efeito pró-inflamatório da beta-glucana é importante, pois os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias estão associados à resolução mais rápida das infecções causadas por *E. coli* (Long et al., 2010). Como

consequência, a beta-glucana além de estimular a capacidade fagocítica de neutrófilos e monócitos, também os habilitam a produzir mais espécies reativas de oxigênio (ERO), melhorando inespecificamente a capacidade e a eficácia fagocítica destas células (Rubin-Bejerano et al., 2007; Sener et al., 2005). Se por um lado a beta-glucana aumenta a atividade e a efetividade fagocitária prevenindo a multiplicação bacteriana, por outro, é factível especular que um o estímulo excessivo promovido por altas doses de beta-glucana possa promover uma produção exacerbada de EROs em resposta a uma infecção bacteriana. De fato, o excesso de EROs pode implicar em aumento apoptose e necrose (Morgan et al., 2008). A beta-glucana também apresenta um efeito anti-inflamatório (Queiroz et al., 2010), em alguns casos tratado como imunossupressor (Du Bin et al., 2015; WANG et al., 2014). *In vitro*, a beta-glucana pode promover diminuição da produção de citocinas inflamatórias como por exemplo o óxido nítrico, TNF- α e IL6 em macrófagos estimulados com LPS (Jo et al., 2010) e inibir a fosforilação de p38 MAPK, com subsequente inibição da produção das citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL8, IL2 e IL12 (Wang et al., 2014). Desta forma, também é razoável especular que um o estímulo excessivo promovido por altas doses de beta-glucana possa promoverum desequilíbrio na sua atividade anti-inflamatória/imunossupressora.

Nessas condições, a necrose pode ocorrer devido a ação da *E. coli* as células e da toxina Stx sobre o seu receptor Gb3/D77 provocando a morte celular programada chamada apoptose (Celi et al., 2022; Goldstein et al., 2021). Segundo os autores, o receptor Gb3/CD77 está presente em diversas células do organismo como exemplo epitélio intestinal, monócitos, células dendríticas e linfócitos. A presença do receptor faz com as células sejam susceptíveis a ação da Stx. A expressão do Gb3/CD77 na célula é variável com a fase do ciclo celular com o ambiente em que a célula está inserida. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL1 β aumentam a expressão de Gb3/CD77. A ligação da Stx ao seu receptor inibe a síntese de proteínas e induz a apoptose e necrose. Porém o seu papel neste processo ainda não é bem conhecido. Sabe-se que o Gb3/CD77 interage com o receptor FAS e que é essencial para ativação da apoptose via FAS-caspase, bem como através da ativação do Bcl-2 – Bax e liberação de citocromo C e EROs. A Stx parece estar envolvida no processo de apoptose na medida em que ao se ligar ao Gb3/CD77 e este forma uma vesícula com a membrana plasmática que faz o transporte retrógrado da Stx para o retículo

endoplasmático, protegendo-a da ação das enzimas lisossomais. No retículo endoplasmático a subunidade A da Stx é clivada e impede a síntese proteica ribossomal levando a célula ao estresse e apoptose. Portanto a necrose observada nos segmentos distais também pode ter sido efeito da ação da própria Stx e por uma menor ação da resposta inflamatória local.

4.2 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE ÓRGÃOS HEMATOLINFÓIDES

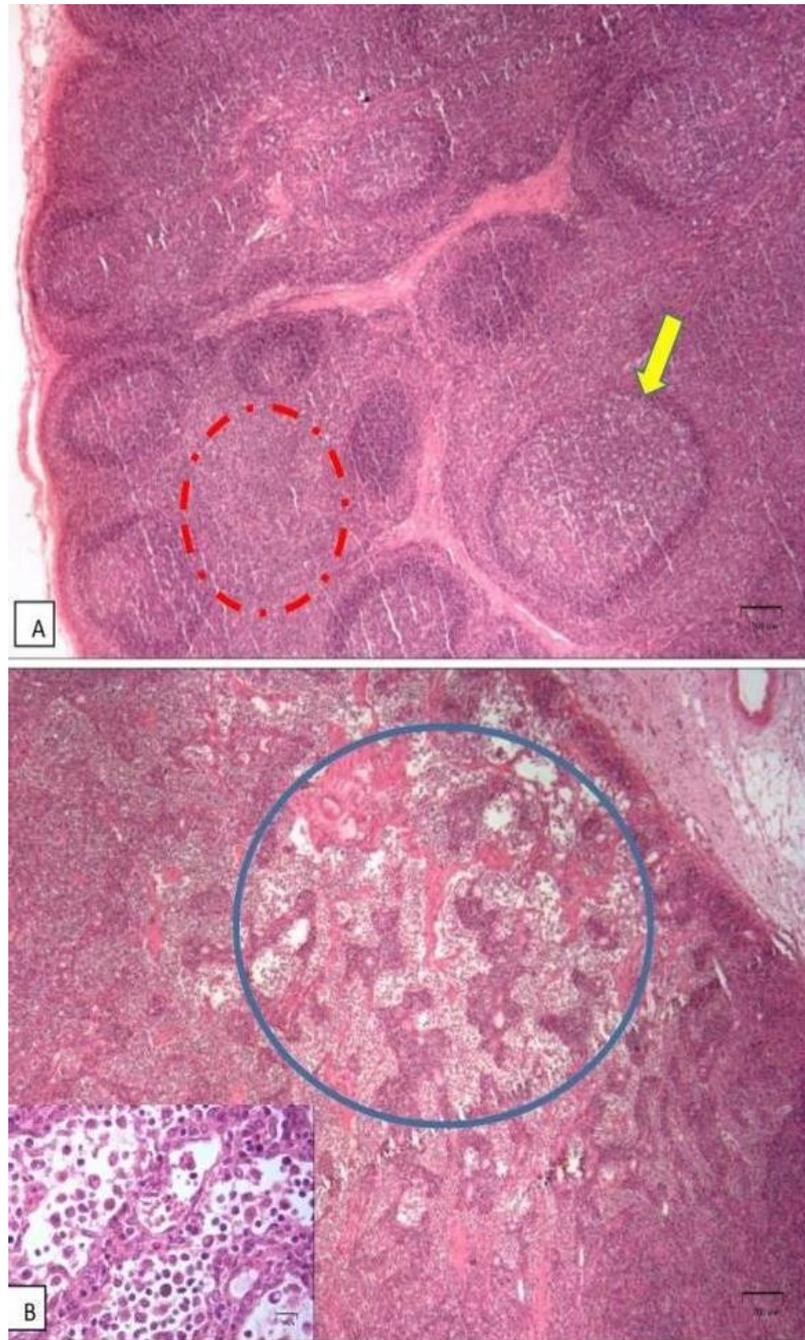
Apesar de nenhum animal apresentar de fibrina na serosa, a avaliação de órgãos internos envolvidos resposta imune pode fornecer evidências de septicemia pontuais ou subaguda e de efeitos histopatológicos sistêmicos da ação da beta-glucana e da infecção por *E. coli*.

4.2.1 Alterações histopatológicas em linfonodos mesentérico cranial, linfonodo mesentérico caudal e linfonodo ileocecal

Os linfonodos mesentéricos craniais, caudais e íleo-cecais são parte do sistemalinfático e desempenham um papel importante na resposta imunológica do intestino. Especificamente esses linfonodos apresentam relevante importância por drenarem segmentos do sistema digestivo pelos quais a *E. coli* possui tropismo.

Na análise morfológica dos linfonodos mesentéricos craniais, caudais e íleo-cecais não foram encontradas lesões compatíveis com abscessos, necrose ou presença de bactérias. Quase que a totalidade dos linfonodos avaliados apresentaram hiperplasia das regiões foliculares e interfoliculares, acompanhada de infiltrado de neutrófilos e eosinófilos (Figura 24), que são consequência da infecção causada pela *E. coli* (Larzabal et al., 2020). Ao se ranquear as variáveis analisadas não foi identificada diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 24 – Fotomicrografia representativa de linfonodo.



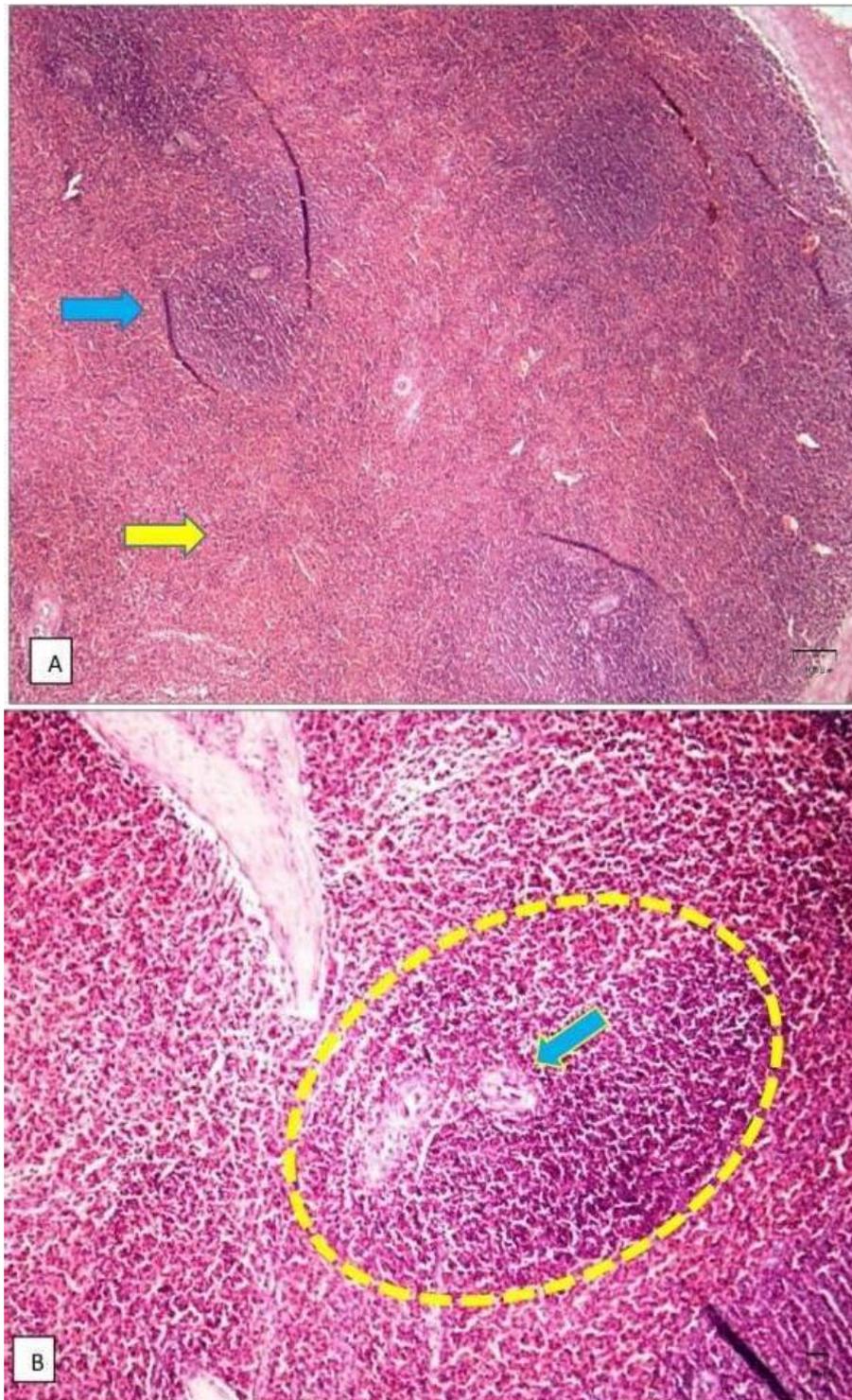
A-Hiperplasia linfóide folicular (seta amarela) e interfolicular (círculo vermelho). Aumento 4X, HE. B-Hiperplasia sinusal (círculo azul) e em destaque os seios preenchidos por células inflamatórias Aumentos 4X, 40X, HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.2.2 Alterações histopatológicas esplênicas

O baço desempenha importante papel na resposta imune e adaptativa e inata, sendo rico em linfócitos e hemácias.

As alterações esplênicas avaliadas foram normalidade, hiperplasia de polpa branca, hiperplasia de polpa vermelha, hipoplasia de polpa branca, necrose, presença de neutrófilos, eosinófilos e granulomas. Para avaliar a condição geral do baço, estas variáveis foram ranqueadas e o somatório das variáveis utilizados para compor o Índice de Atividade Esplênica (IAE). Não houve diferença estatística entre os grupos para nenhuma das variáveis avaliadas. O IAE dos grupos controle, G1, 2, 3 e 4 foram respectivamente, $4 \pm 4,93$; $1,8 \pm 0,4$; $5,8 \pm 5,5$; $2,6 \pm 2,3$; e $4 \pm 3,7$. Destaca-se que um animal de cada tratamento apresentou baço normal, enquanto os demais apresentaram hiperplasia de polpa branca, representada na Figura 25. Nenhuma amostra apresentou granuloma e a ocorrência de neutrófilos e eosinófilos foi esporádica.

Figura 25 – Fotomicrografia representativa do baço



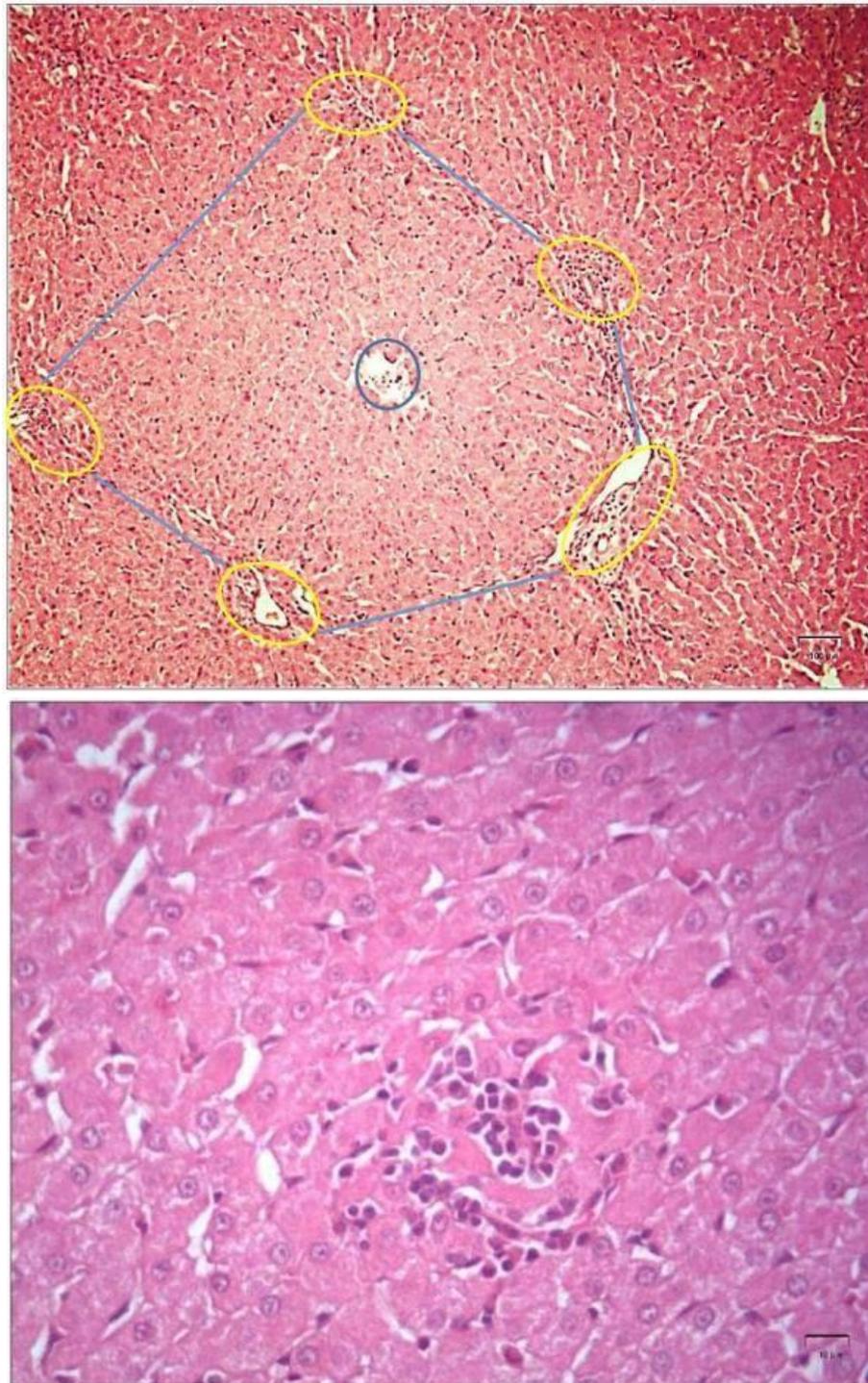
A - Hiperplasia de polpa branca (seta azul) e expansão da polpa vermelha (seta amarela) (10X). B –Polpa branca: folículo linfóide com artéria central (seta azul). Aumento 40X, HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.2.3 Alterações histopatológicas hepáticas

O fígado possui uma importante participação em processos infecciosos, isso, porque, proteínas de fase aguda (PFA) como fibrinogênio, haptoglobina, amiloide sérico A e proteína C reativa, são produzidas no fígado por estímulo de citocinas e tendem a aumentar entre 12 a 48h após um desafio ao sistema imune (Gruys et al., 2005). Adicionalmente, segundo os autores, as PFA também participam da resposta imune já que possuem capacidade de ativar o sistema complemento e ligar-se a patógenos e a debris celulares. Em bovinos que receberam suplementação alimentar por 45 dias com extrato de parede de leveduras tiveram seus níveis de PFA reduzidos quando comparados com o grupo que não recebeu suplementação (Burdick et al., 2021). Por outro lado, bezerros com diarreia por *E. coli* apresentam aumento da haptoglobulina plasmática (Choi et al., 2021). Diante dessa importância, amostras de fígado foram avaliadas quanto a presença de: Infiltrado neutrofílico lobular; Infiltrado linfoplasmocitário lobular; Infiltrado eosinofílico portal; Infiltrado neutrofílico portal; Infiltrado linfoplasmocitário portal; Infiltrado eosinofílico lobular; Esteatose macrovesicular; Esteatose microvesicular; Balonização; Colestase; Venoclusão; e Granuloma. Ao serem ranqueadas não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos.

A figura 26 representa um corte histológico frequentemente identificado entre os tratamentos, no qual pode ser identificado infiltrado portal, periductal, linfocitário leve com raros neutrófilos. No parênquima hepático observou-se discreta atividade lobular com infiltrado de linfócitos e raros neutrófilos. Esteatose macrovesicular ou microvesicular, balonização, colestase, venoclusão, vasculite e granuloma estavam ausentes em todas as lâminas.

Figura 26 – Fotomicrografia representativa do lóbulo hepático

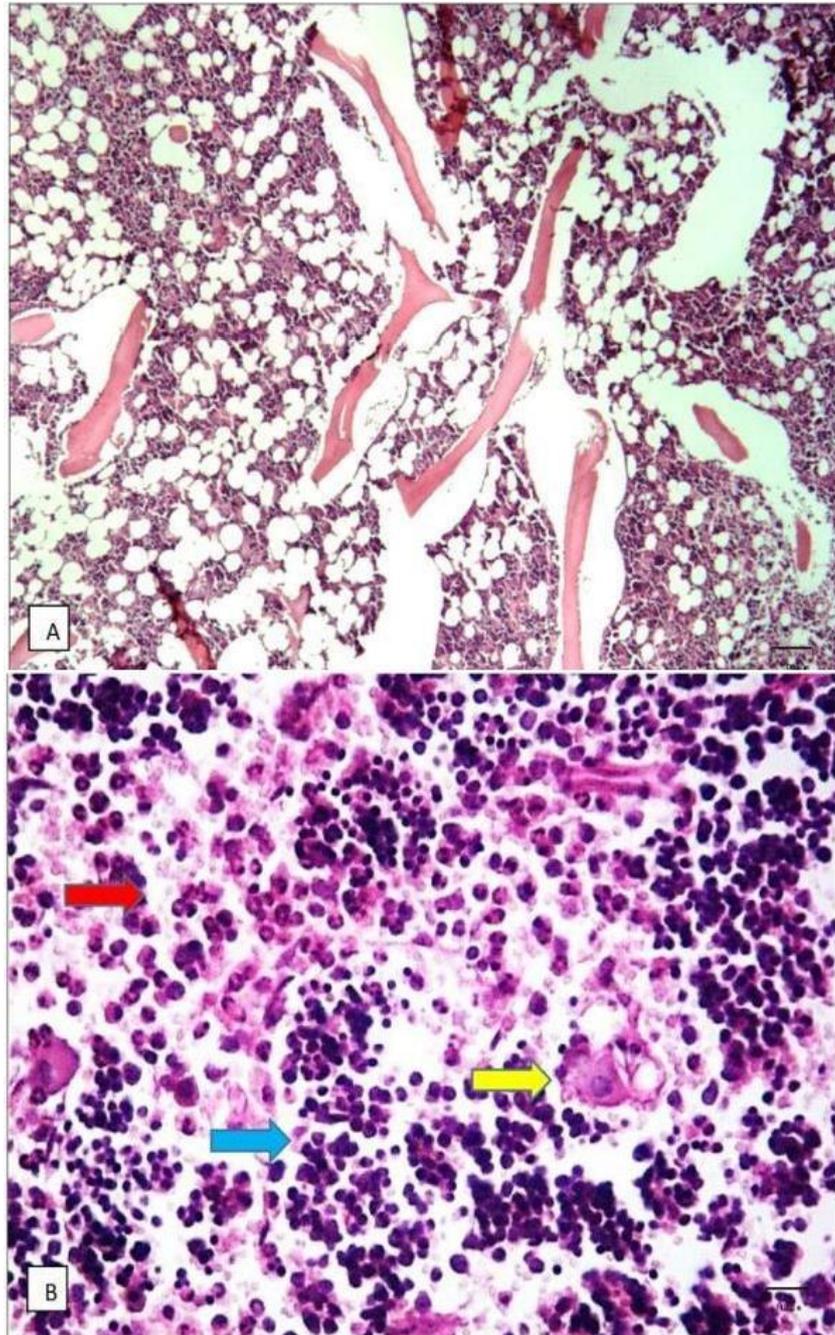


A - Hepatócitos organizados em trabéculas em torno da veia centrolobular (círculo azul) e 5 espaços porta nas extremidades (círculos amarelos) (4X). B – Infiltrado inflamatório lobular focal (seta azul) com linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos, sem alterações histológicas de hepatócitos. Aumento 40X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.2.4 Alterações histopatológicas na medula óssea

Não foram observadas alterações morfológicas na medula óssea. Todas as amostras apresentavam celularidade global variando entre 80 e 100%, considerada normal para idade dos bezerros, com maturação, proporção e distribuição normais, representadas na figura 27. Fibrose, degeneração gelatinosa e granuloma foram ausentes.

Figura 27 – Fotomicrografia representativa da medula óssea



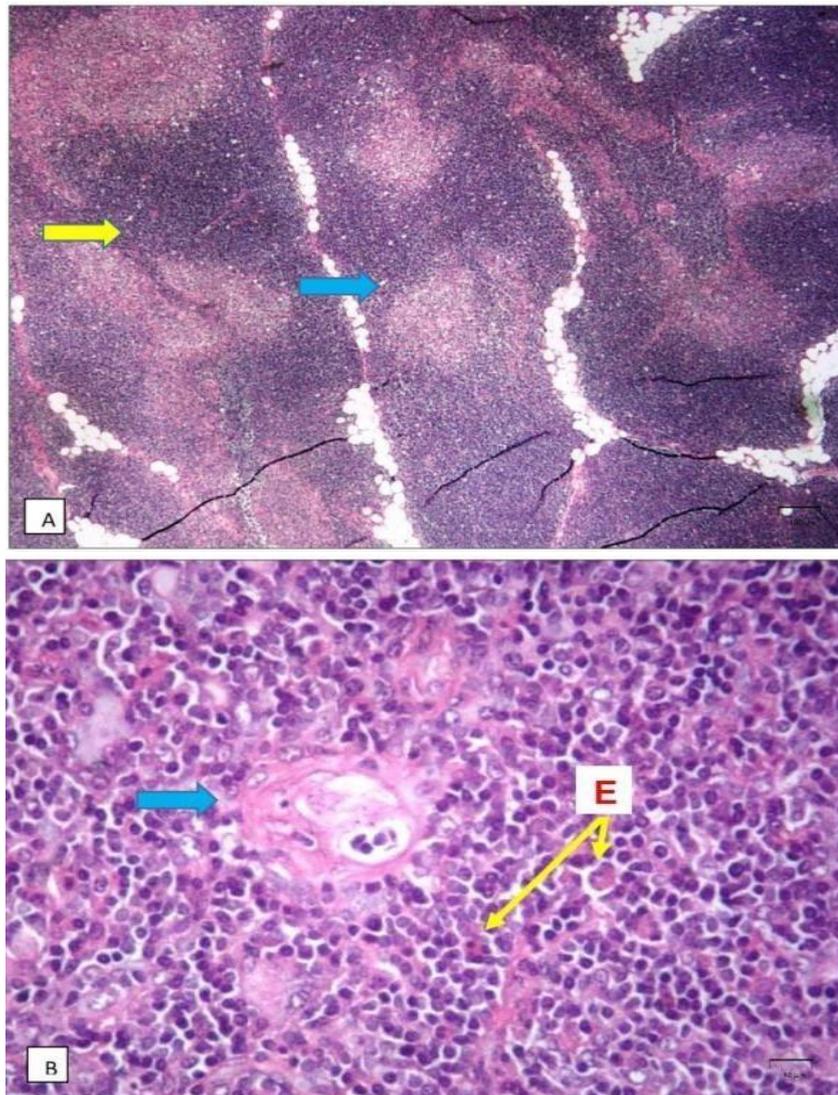
A - Células hematopoiéticas entremeadas por tecido adiposo. Celularidade global adequada para idade (4X). B – Precusores eritróides representando cerca de 60% da celularidade, organizados em grupos (seta azul). Precusores granulocíticos com citoplasmas eosinofílicos e núcleos segmentados (seta vermelha). Megacariócitos: células grandes, com citoplasma amplo eosinofílico (seta

amarela). Aumento 40X, coloração HE. Fonte:Elaborado pela autora (2024).

4.2.5 Alterações histopatológicas no timo

Todos as amostras de timo exibiram os mesmos aspectos morfológicos, não havendo diferença entre os grupos. Todas apresentaram hiperplasia medular e cortical com infiltrado de neutrófilos e eosinófilos (Figura 28).

Figura 28 – Fotomicrografia representativa do timo.



A – Hiperplasia das regiões medular (seta azul) e cortical (seta amarela) entremeadas por tecido adiposo (4X). B – Medular contendo o corpúsculo de Hassall (seta azul) rodeado por linfócitos e alguns eosinófilos (E). Aumento 40X, coloração HE. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Baseando-se nas alterações encontradas no trato gastrointestinal, pode-se afirmar que a administração diária 12 mg/kg de peso vivo de beta-glucana para bezerros lactentes foi efetiva na redução da intensidade das lesões causadas por uma infecção induzida com 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC). O mecanismo pelo qual esse efeito ocorreu não foi avaliado. Todavia, embasado na literatura científica e nos achados de aumento da frequência microabscessos, atribui-se esse efeito ao estímulo do sistema imune.

Por outro lado, animais que receberam doses diárias mais elevadas de beta-glucana (*i.e.* 36, 60 e 84 mg/kg de peso vivo) apresentaram intensidade das lesões causadas por uma infecção induzida com 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC) semelhantes ao grupo controle. Em comparação ao tratamento do grupo 1, o mecanismo pelo qual doses diárias maiores de beta-glucana resultam em redução na capacidade de resposta frente a desafio de *E. coli* não foi avaliado, contudo pode-se hipotetizar que a sobredosagem de beta-glucana gere uma resposta imune exacerbada, que em conjunto com a *E. coli* aumente as lesões teciduais; ou que a sobredosagem de beta-glucana induza a uma discreta imunossupressão dos animais dos grupos 2, 3 e 4 em relação aos animais do grupo 1, igualando a capacidade de resposta dos grupos 2, 3 e 4 ao grupo controle.

5 CONCLUSÃO

- A administração diária 12 mg/kg de peso vivo de beta-glucana para bezerros lactentes foi efetiva na redução da intensidade das lesões causadas por uma infecção induzida com 10^{10} UFC de *E. coli* (STEC/ETEC).
- Animais que receberam doses diárias mais elevadas de beta-glucana (*i.e.* 36, 60 e 84 mg/kg de peso vivo) apresentaram intensidade das lesões.

5.1 PERSPECTIVAS

Estudos futuros à luz de técnicas apuradas de análises biológicas da produção e expressão gênica de citocinas e receptores da resposta imunológica como TLR4, conjuntamente com dados clínicos e morfológicos poderão explicar e confirmar as hipóteses aqui tratadas. De forma complementar, a utilização de técnicas de imunohistoquímica para identificar citocinas, tipos celulares específicos e marcadores biológicos de processos inflamatórios nos cortes histológicos de amostras já coletadas também podem ser importantes para auxiliar na elucidação das vias de ação da beta-glucana.

REFERÊNCIAS

- Acres SD. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *Journal of Dairy Science*. 1985 Jan 1;68(1):229-56.
- Adachi Y, Ishii T, Ikeda Y, Hoshino A, Tamura H, Aketagawa J, Tanaka S, Ohno N. Characterization of β -glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infection and immunity*. 2004 Jul;72(7):4159-71.
- Akramienė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina*. 2007 Aug;43(8):597.
- Amelia TS, Govindasamy S, Tamothran AM, Vigneswari S, Bhubalan K. Applications of PHA in agriculture. In *Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates 2019* (pp. 347-361).
- Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jun 30;275(26):20157-67. Springer, Singapore.
- Arotoma Chujutalli LF, Pacahuala Jines MF. Revisión bibliográfica de la elaboración de bioplástico a partir de residuos de origen animal y vegetal.
- Barton C, Vigor K, Scott R, Jones P, Lentfer H, Bax HJ, Josephs DH, Karagiannis SN, Spicer JF. Beta-glucan contamination of pharmaceutical products: How much should we accept?. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2016 Nov; 65:1289-301.
- Bashir KM, Choi JS. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. *International journal of molecular sciences*. 2017 Sep 5;18(9):1906.
- Beck EJ, Tapsell LC, Batterham MJ, Tosh SM, Huang XF. Increases in peptide YY levels following oat β -glucan ingestion are dose-dependent in overweight adults. *Nutrition Research*. 2009 Oct 1;29(10):705-9.

- Belcarz A, Ginalska G, Pycka T, Zima A, Ślósarczyk A, Polkowska I, Paszkiewicz Z, Piekarczyk W. Application of β -1, 3-glucan in production of ceramics-based elastic composite for bone repair. *Open Life Sciences*. 2013 Jun 1;8(6):534-48.
- Berg DJ, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4 (+) TH1-like responses. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Aug 15;98(4):1010-20.
- Besser TE, Richards BL, Rice DH, Hancock DD. Escherichia coli O157 [ratio] H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiology & Infection*. 2001 Dec;127(3):555-60.
- Bhattarai S, Li Q, Ding J, Liang F, Gusev E, Lapohos O, Fonseca GJ, Kaufmann E, Divangahi M, Petrof BJ. TLR4 is a regulator of trained immunity in a murine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*. 2022 Feb 15;13(1):879.
- Bhunias AK, Bhunias AK. General mechanism of pathogenesis. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. 2018:87-115.
- Böhm J. Gelatinous transformation of the bone marrow: the spectrum of underlying diseases. *The American journal of surgical pathology*. 2000 Jan 1;24(1):56.
- Bohn JA, BeMiller JN. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate polymers*. 1995 Jan 1;28(1):3-14.
- Brown GD, Gordon S. A new receptor for β -glucans. *Nature*. 2001 Sep 6;413(6851):36-7.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *The Journal of experimental medicine*. 2003 May 5;197(9):1119-24.
- Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology*. 2006 Jan 1;6(1):33-43.
- Bozbulut R, Sanlier N. Promising effects of β -glucans on glycaemic control in diabetes. *Trends in Food Science & Technology*. 2019 Jan 1; 83:159-66.

Burdick Sanchez NC, Broadway PR, Carroll JA. Influence of yeast products on modulating metabolism and immunity in cattle and swine. *Animals*. 2021 Feb 2;11(2):371.

Campbell A, Schneider SJ, Song B. Lambdoid phages as elements of bacterial genomes(integrase/phage21/Escherichia coli K-12/icd gene). *Genetica*. 1992 Jan;86:259-67.

Cebra JJ, Jiang HQ, Boiko N, Tlaskalova-Hogenova H. The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system.

Mucosal Immunology. 2005:335.

Celi AB, Goldstein J, Rosato-Siri MV, Pinto A. Role of globotriaosylceramide in physiology and pathology. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022 Feb 23; 9:813637.

Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of hematology & oncology*. 2009 Dec; 2:1-1.

Chase CC, Hurley DJ, Reber AJ. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2008 Mar 1;24(1):87-104.

Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 2005 Nov 1;26(33):6565-78.

Choi KS, Kang JH, Cho HC, Yu DH, Park J. Changes in serum protein electrophoresis profiles and acute phase proteins in calves with diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2021 Jan 1;85(1):45-50.

Chu, A. Immunomodulation by Shiga Toxin 2. Ph.D. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada, 2010. Disponível online: <https://harvest.usask.ca/server/api/core/bitstreams/72abc4f1-8399-452f-9769-e80a9665a8a4/content> (Acessado em 11 de fevereiro de 2024).

Cole NA, Purdy CW, Hutcheson DP. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *Journal of Animal Science*. 1992 Jun 1;70(6):1682-90.

Cordonnier C, Etienne-Mesmin L, Thévenot J, Rougeron A, Rénier S, Chassaing B, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Blanquet-Diot S, Livrelli V. Enterohemorrhagic Escherichiacoli pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Scientific reports*. 2017 Mar 20;7(1):44655.

Coura FM, Lage AP, Heinemann MB. Patotipos de Escherichia coli causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014;34:811-8.

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*. 2013 Oct;26(4):822-80.

Cruvinel WD, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Silva NP, Andrade LE. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2010;50:434-47.

Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019 Aug;16(8):461-78.

Dall Agnol AM, Lorenzetti E, Leme RA, Ladeia WA, Mainardi RM, Bernardi A, Headley SA, Freire RL, Pereira UP, Alfieri AF, Alfieri AA. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021 Dec;52(4):2547-53.

Delatte SJ, Evans J, Hebra A, Adamson W, Othersen HB, Tagge EP. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *Journal of Pediatric Surgery*. 2001 Jan 1;36(1):113-8.

Du Bin DB, Lin ChengYuan LC, Bian ZhaoXiang BZ, Xu BaoJun XB. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*, 2015; 41(1): 49-59.

Eldesoukey IE, Elmonir W, Alouffi A, Beleta EI, Kelany MA, Elnahriry SS, Alghonaim MI, alZeyadi ZA, Elaadli H. Multidrug-resistant enteropathogenic Escherichia coli

isolated from diarrhoeic calves, milk, and workers in dairy farms: a potential public health risk. *Antibiotics*. 2022 Jul 25;11(8):999.

El Khoury D, Cuda C, Luhovyy BL, Anderson GH. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. *Journal of nutrition and metabolism*. Oct;2012.

Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Sauvanet P, Denizot J, Blanquet-Diot S, Darfeuille-Michaud A, Pradel N, Livrelli V. Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PloS one*. 2011 Aug 17;6(8):e23594.

Ferraz EG, Silveira BB, Sarmiento VA, Santos JN. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. *RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)*. 2011 Sep;59(3):483-90.

Fitzhenry RJ, Pickard DJ, Hartland EL, Reece S, Dougan G, Phillips AD, Frankel G. Intimintype influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Gut*. 2002 Feb;50(2):180.

Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal immunology*. 2012 Jul 1;5(4):354-66.

Geller A, Shrestha R, Yan J. Yeast-derived β -glucan in cancer: novel uses of a traditional therapeutic. *International journal of molecular sciences*. 2019 Jul 24;20(15):3618.

George A, Sanjay MR, Srisuk R, Parameswaranpillai J, Siengchin S. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites.

International Journal of Biological Macromolecules. 2020 Jul 1; 154:329-38.

Gimenes GC, Dias EH, Dias SH, Bastos GL, Gerbasi AR, Almada AF, Borges JL, Gonçalves DD, Simões JV, Piau Júnior R. Efficiency of oral supplementation of 1.3-1.6 beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the control of bovine mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2020 Aug 14; 72:1441-8.

Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological reviews*. 2009 Jul;230(1):38-50.

Govindarajan DK, Viswalingam N, Meganathan Y, Kandaswamy K. Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its role in pathogenesis. *Medicine in Microecology*. 2020 Sep 1;5:100025.

Grondin JA, Kwon YH, Far PM, Haq S, Khan WI. Mucins in intestinal mucosal defense and inflammation: learning from clinical and experimental studies. *Frontiers in immunology*. 2020 Sep 4;11:559710.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2005 Nov;6(11):1045-56.

Guan G, Ding S, Yin Y, Duraipandiyar V, Al-Dhabi NA, Liu G. *Macleaya cordata* extract alleviated oxidative stress and altered innate immune response in mice challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Science China Life Sciences*. 2019 Aug;62:1019-27.

Gupta T, Kaur H, Kapila S, Kapila R. Potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* MTCC-5897 attenuates *Escherichia coli* induced inflammatory response in intestinal cells. *Archives of Microbiology*. 2021 Nov;203(9):5703-13.

Hall GA, Reynolds DJ, Parsons KR, Bland AP, Morgan JH. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. *Research in veterinary science*. 1988 Sep 1;45(2):240-50.

Hannood S, Nasuruddin DN. Acute Inflammatory Response. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>

Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, Hale C, Matthews S, Dougan G, Knutton S, Connerton I, Frankel G. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Molecular microbiology*. 1999 Apr;32(1):151-8.

Havrlentova M, Petrulakova Z, Burgarova A, Gago F, Hlinkova A, Šturdík E. β -glucans and their significance for the preparation of functional foods—a review. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011 Feb 14;29(1):1-4.

He L, Wang C, Simujide H, Aricha H, Zhang J, Liu B, Zhang C, Cui Y, Aorigele C. Effect

of early pathogenic *Escherichia coli* infection on the intestinal barrier and immune function in newborn calves. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022 Feb 21;12:173.

Hino, S.; Nishimura, N.; Matsuda, T.; Morita, T. Intestinal Absorption of β -Glucans and Their Effect on the Immune System. *Preprints 2020*, 2020120250.
<https://doi.org/10.20944/preprints202012.0250.v1>

Hoey DE, Sharp L, Currie C, Lingwood CA, Gally DL, Smith DG. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cellular microbiology*. 2003 Feb;5(2):85-97.

Hong F, Hansen RD, Yan J, Allendorf DJ, Baran JT, Ostroff GR, Ross GD. β -Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer research*. 2003 Dec 15;63(24):9023-31.

Honda M, Kubes P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2018 Apr;15(4):206-21.

Hullahalli K, Dailey KG, Hasegawa Y, Torres E, Suzuki M, Zhang H, Threadgill DW, Navarro VM, Waldor MK. Genetic and immune determinants of *E. coli* liver abscess formation.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2023 Dec 19;120(51):e2310053120.

Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infection and immunity*. 2001 Oct 1;69(10):6148-55.

Jha A, Kumar A. Biobased technologies for the efficient extraction of biopolymers from waste biomass. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2019 Dec;42(12):1893-901.

Jin RC, Loscalzo J. Vascular nitric oxide: formation and function. *Journal of blood medicine*. 2010 Aug 13:147-62.

Jo WS, Choi YJ, Mm HJ, Lee JY, Nam BH, Lee JD, Lee SW, Seo SY, Jeong MH. The anti-inflammatory effects of water extract from *Cordyceps militaris* in murine macrophage.

Mycobiology. 2010 Mar 1;38(1):46-51.

Johnson AB, Burns B. Hemorrhage. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542273/>

Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*. 2013 May;13(5):321-35.

Kamali Dolatabadi R, Feizi A, Halaji M, Fazeli H, Adibi P. The prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* and its association with inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*. 2021 Dec 3;8: 730243.

Kanjan P, Sahasrabudhe NM, de Haan BJ, de Vos P. Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *Journal of functional foods*. 2017 Oct 1; 37:433-40.

Kanjou MM, Abdulhakim H, de Olyveira GM, Basmaji P. 3-D print cellulose nanoskin: future diabetic wound healing. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2019 Sep 20;10(4):190-5.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*. 2004 Feb;2(2):123-40.

Khalid N, Azimpouran M. Necrosis. [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>

Kim MH, Seo JK, Yun CH, Kang SJ, Ko JY, Ha JK. Effects of hydrolyzed yeast supplementation in calf starter on immune responses to vaccine challenge in neonatal calves. *Animal*. 2011 Jan 1;5(6):953-60.

Larzabal M, Da Silva WM, Multani A, Vagnoni LE, Moore DP, Marin MS, Riviere NA, Delgado FO, Vilte DA, Victorica MR, Ma T. Early immune innate hallmarks and

microbiome changes across the gut during Escherichia coli O157: H7 infection in cattle. *Scientific Reports*. 2020 Dec 9;10(1):21535.

Lee JN, Lee DY, Ji IH, Kim GE, Kim HN, SoHN J, Kim S, KIM CW. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast.

Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2001;65(4):837-41.

Lee SB, Jeon HW, Lee YW, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS, Ahn HC. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -glucan. *Biomaterials*. 2003 Jun 1;24(14):2503-11.

Li B, Allendorf DJ, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, Yan J. Yeast β -glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3- Syk- phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Immunology*. 2006 Aug 1;177(3):1661-9.

Liatis S, Tsapogas P, Chala E, Dimosthenopoulos C, Kyriakopoulos K, Kapantais E, Katsilambros N. The consumption of bread enriched with β -glucan reduces LDL-cholesterol and improves insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2009 Apr 1;35(2):115-20.

Liu M, Luo F, Ding C, Albeituni S, Hu X, Ma Y, Cai Y, McNally L, Sanders MA, Jain D, Kloecker G. Correction: Dectin-1 Activation by a Natural Product β -Glucan Converts Immunosuppressive Macrophages into an M1-like Phenotype. *The Journal of Immunology*. 2016 May 1;196(9):3968-.

Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont HL, Nanthakumar NN, Estrada-Garcia T. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infection and immunity*. 2010 Mar;78(3):1221-8.

Lopez AJ, Heinrichs AJ. Invited review: The importance of colostrum in the newborn dairy calf. *Journal of dairy science*. 2022 Apr 1;105(4):2733-49.

Madhavan TV, Sakellaris H. Colonization factors of enterotoxigenic Escherichia coli. *Advances in applied microbiology*. 2015 Jan 1;90:155-97.

Magalhães VJ, Susca F, Lima FS, Branco AF, Yoon I, Santos JE. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of dairy science*. 2008 Apr 1;91(4):1497-509.

Magnani M, Castro-Gómez RJ. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 2008 Jul;29(3):631-50.

Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC. The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from yeast cellwalls. *Biochemical Journal*. 1973 Sep;135(1):19-30.

Mansilla FC, Moore DP, Quintana ME, Cardoso N, Hecker YP, Gual I, Czepluch W, Odeón AC, Capozzo AV. Safety and immunogenicity of a soluble native *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucan adjuvant in pregnant cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2015 May 15;165(1-2):75-80.

Menge C, Stamm I, van Diemen PM, Sopp P, Baljer G, Wallis TS, Stevens MP. Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Journal of medical microbiology*. 2004 Jun;53(6):573-9.

Menge C. The role of *Escherichia coli* Shiga toxins in STEC colonization of cattle. *Toxins*. 2020 Sep 21;12(9):607.

Mohan D, Khairullah NF, How YP, Sajab MS, Kaco H. 3D printed laminated CaCO₃-nanocellulose films as controlled-release 5-fluorouracil. *Polymers*. 2020 Apr 23;12(4):986.

Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG. TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell research*. 2008 Mar;18(3):343-9.

Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Applied and environmental microbiology*. 2007 May 15;73(10):3380-90.

- Murphy EJ, Rezoagli E, Major I, Rowan NJ, Laffey JG. β -glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. *Journal of Fungi*. 2020 Dec 10;6(4):356.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998 Jan 1;11(1):142-201.
- Nakkarach A, Foo HL, Song AA, Mutalib NE, Nitisingprasert S, Withayagiat U. Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by *Escherichia coli* isolated from healthy human gut microbiota. *Microbial Cell Factories*. 2021 Dec;20:1-7.
- Nishitani Y, Zhang L, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M. Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial cells. *PloS one*. 2013 Apr 22;8(4):e62441.
- Nyholm O, Heinikainen S, Pelkonen S, Hallanvuo S, Haukka K, Siitonen A. Hybrids of Shiga toxinogenic and enterotoxinogenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) among human and animal isolates in Finland. *Zoonoses and Public Health*. 2015 Nov;62(7):518-24.
- Novak M, Vetvicka V. β -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of immunotoxicology*. 2008 Jan 1;5(1):47-57.
- Novo SM, dos Reis Costa JF, Baccili CC, Sobreira NM, Silva BT, de Oliveira PL, Hurley DJ, Gomes V. Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. *Research in veterinary science*. 2017 Jun 1;112:97-104.
- Ok M, Güler L, Turgut K, Ok Ü, Şen I, Gündüz IK, Birdane MF, Güzelbekteş H. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*. 2009 Mar;56(2):94-101.
- Othman RA, Moghadasian MH, Jones PJ. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. *Nutrition reviews*. 2011 Jun 1;69(6):299-309.
- Pedro AR, Lima T, Fróis-Martins R, Leal B, Ramos IC, Martins EG, Cabrita AR, Fonseca AJ, Maia MR, Vilanova M, Correia A. Dectin-1-mediated production of pro-inflammatory cytokines induced by yeast β -glucans in bovine monocytes. *Frontiers in Immunology*. 2021 May 28;12:689879.

Porsani MY, Paludetti M, Orlando DR, Peconick AP, Costa RC, Oliveira LE, Zangeronimo MG, Sousa RV. Protective effect of β -glucan and glutamine on intestinal and immunological damage in mice induced by cytarabine (Ara-C). *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

2017;37:977-83.

Pruimboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA, Moon HW. Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157: H7 Shiga toxins.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000 Sep 12;97(19):10325-9.

Pushkala S, Seshayyan S, Theranirajan E, Sudhakar D, Raghavan K, Dedeepiya VD, Ikewaki N, Iwasaki M, Preethy S, Abraham SJ. Efficient control of IL-6, CRP and Ferritin in Covid-19 patients with two variants of Beta-1, 3-1, 6 glucans in combination, within 15 days in an open-label prospective clinical trial. *medRxiv*. 2021 Dec 16:2021- 12.

Queiroz LS, Nascimento MS, Cruz AK, Castro AJ, Maria de Fátima VM, Baseia IG, Araújo RM, Benevides NM, Lima LF, Leite EL. Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. *International immunopharmacology*. 2010 Jan 1;10(1):34-42.

Raghavan K, Dedeepiya VD, Suryaprakash V, Rao KS, Ikewaki N, Sonoda T, Levy GA, Iwasaki M, Senthilkumar R, Preethy S, Abraham SJ. Beneficial Effects of novel *aureobasidium pullulans* strains produced beta-1, 3-1, 6 glucans on interleukin-6 and D- Dimer levels in COVID-19 patients; results of a randomized multiple-arm pilot clinical study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Jan 1;145:112243.

Rodrigues MV, Zanuzzo FS, Koch JF, de Oliveira CA, Sima P, Vetvicka V. Development of fish immunity and the role of β -glucan in immune responses. *Molecules*. 2020 Nov 17;25(22):5378.

Rotstein OD. Role of fibrin deposition in the pathogenesis of intraabdominal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1992 Nov;11:1064- 8.

Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell host & microbe*. 2007 Jul 12;2(1):55-67.

Saetang N, Ramaraj R, Unpaprom Y. Optimization of ethanol precipitation of schizophyllan from *Schizophyllum commune* by applied statistical modelling. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022 Feb 1:1-3.

Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen FE. Oral and systemic administration of β -glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clinical & Experimental Immunology*. 2007 Apr;148(1):168-77.

Sahasrabudhe NM, Dokter-Fokkens J, de Vos P. Particulate β -glucans synergistically activate TLR4 and Dectin-1 in human dendritic cells. *Molecular nutrition & food research*. 2016 Nov;60(11):2514-22.

Şener G, Toklu H, Ercan F, Erkanlı G. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *International immunopharmacology*. 2005 Aug 1;5(9):1387-96.

Silva LF, Coimbra LG, Eyre K. Malnutrition of pregnant beef cows and the impact on passive immunity transfer to calves. *Animal Production Science*. 2023 Jul 20.

Sina C, Kemper C, Derer S. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function. In *Seminars in immunology* 2018 Jun 1 (Vol. 37, pp. 66-73). Academic Press.

Smiderle FR, Olsen LM, Carbonero ER, Baggio CH, Freitas CS, Marcon R, Santos AR, Gorin PA, Iacomini M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*. 2008 Nov 12;597(1-3):86-91.

Sonck E, Stuyven E, Goddeeris B, Cox E. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010 Jun 15;135(3-4):199-207.

- Stein GM, Pfüller U, Schietzel M, Büssing A. Expression of interleukin-4 in apoptotic cells: Stimulation of the type-2 cytokine by different toxins in human peripheral blood mononuclear and tumor cells. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2000 Dec 1;41(4):261-70.
- Stuyven E, Cox E, Vancaeneghem S, Arnouts S, Deprez P, Goddeeris BM. Effect of β -glucans on an ETEC infection in piglets. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2009 Mar 15;128(1-3):60-6.
- Takaloo Z, Nemati R, Nikkhah M, Sajedi RH. Binding efficacy and prebiotic properties of commercial yeast cell walls toward aflatoxins and pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. *Animal Nutrition and Feed Technology*. 2023;23(2):205-20.
- Talmon G, Manasek T, Miller R, Muirhead D, Lazenby A. The apoptotic crypt abscess: an underappreciated histologic finding in gastrointestinal pathology. *American journal of clinical pathology*. 2017 Nov 20;148(6):538-44.
- Tesh VL, Ramegowda B, Samuel JE. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. 1994 Nov;62(11):5085-94.
- Tian Y, Gui W, Koo I, Smith PB, Allman EL, Nichols RG, Rimal B, Cai J, Liu Q, Patterson AD. The microbiome modulating activity of bile acids. *Gut microbes*. 2020 Jul 3;11(4):979-96.
- Ueki T, Mizuno M, Uesu T, Kiso T, Nasu J, Inaba T, Kihara Y, Matsuoka Y, Okada H, Fujita T, Tsuji T. Distribution of activated complement, C3b, and its degraded fragments, iC3b/C3dg, in the colonic mucosa of ulcerative colitis (UC). *Clinical & Experimental Immunology*. 1996 May;104(2):286-92.
- Urtuvia V, Villegas P, González M, Seeger M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International journal of biological macromolecules*. 2014 Sep 1;70:208-13.
- Vannucci L, Krizan J, Sima P, Stakheev D, Caja F, Rajsiglova L, Horak V, Saieh M. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans. *International journal of oncology*. 2013 Aug 1;43(2):357-64.

Vetvicka V, Thornton BP, Ross GD. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b- opsonized target cells. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Jul 1;98(1):50-61.

Vetvicka V. *Beta Glucan: Nature's Secret*, Third Edition Paperback – January 1, 2015. Vetvicka V, Vannucci L, Sima P. β -glucan as a new tool in vaccine development.

Scandinavian journal of immunology. 2020 Feb;91(2):e12833.

Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology & behavior*. 2008 May 23;94(2):276-84.

Wang S, Zhou H, Feng T, Wu R, Sun X, Guan N, Qu L, Gao Z, Yan J, Xu N, Zhao J. β - Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38MAPK pathway. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2014 Mar 1;24(3):248-55.

Wéra O, Lancellotti P, Oury C. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *Journal of clinical medicine*. 2016 Dec 17;5(12):118.

Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive veterinary medicine*. 2014 Feb 1;113(2):231-40.

Wójcik R. The effect of Leiber Beta-S on selected immunity indicators in calves. *Acta Vet.Brno* 2014 Jan 23; 83: 113-118 <https://doi.org/10.2754/avb201483020113>

Wu TC, Xu K, Banchereau R, Marches F, Yu CI, Martinek J, Anguiano E, Pedroza-Gonzalez A, Snipes GJ, O'Shaughnessy J, Nishimura S. Reprogramming Tumor-Infiltrating Dendritic Cells for CD103⁺ CD8⁺ Mucosal T-cell Differentiation and Breast Cancer Rejection. *Cancer immunology research*. 2014 May 1;2(5):487-500.

Xiong W, Huang J, Li X, Zhang Z, Jin M, Wang J, Xu Y, Wang Z. Icaritin and its phosphorylated derivatives alleviate intestinal epithelial barrier disruption caused by

enterotoxigenic *Escherichia coli* through modulate p38 MAPK in vivo and in vitro. *The FASEB Journal*. 2020 Jan;34(1):1783-801.

Yoon J, Ponikau JU, Lawrence CB, Kita H. Innate antifungal immunity of human eosinophils mediated by a β 2 integrin, CD11b. *The Journal of Immunology*. 2008 Aug 15;181(4):2907-15.

Zaatout N. An overview on mastitis-associated *Escherichia coli*: Pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies. *Microbiological research*. 2022 Mar 1;256:126960.

Zhang Y, Tan P, Zhao Y, Ma X. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes*. 2022 Dec 31;14(1):2055943.

Zhou Y, Luo Y, Yu B, Zheng P, Yu J, Huang Z, Mao X, Luo J, Yan H, He J. Effect of β -glucan supplementation on growth performance and intestinal epithelium functions in weaned pigs challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Antibiotics*. 2022 Apr 13;11(4):519.

Zhu F, Du B, Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*. 2016 Jan 1;52:275-88.

Anexo A


**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

FORMULÁRIO 1/4

CPF:	17423427870	Finalidade:	Pesquisa
Título do projeto:	Estudo clínico para determinação dos efeitos de ingrediente imunomodulador administrado oralmente na resposta fisiológica de bezerras.		
Título (inglês):	Clinical trial to determine the ingredients immunomodulatory effects on the physiological response of calves		
Responsável:	Humberto de Mello Brandão		
Celular:	32 991253450	e-mail:	humberto.brandao@embrapa.br
CV. Lattes:	http://lattes.cnpq.br/4646271838089206		
Área:	Núcleo de Saúde Animal e Qualidade do Leite	Campus:	EGL - Gado de Leite
Experiência:	Sim : 22 ano(s)	Treinamento:	Sim : 2 mes(es)
Vínculo:	Pesquisador		
Obj. Acadêmico:	Doutorado	Patente:	Não
Grande área:	Farmacologia	específica:	Farmacologia geral
Patrocínio:	Laboratório/Industria	Patrocinador:	Biorigin
Orientador:	Humberto de Mello Brandão	e-mail:	humberto.brandao@embrapa.br
Chefe de Depto:	Carla Cristine Lange	e-mail:	carla.lange@embrapa.br
Pesquisador 1:			
Nome:	Danielle dos Santos Cinelli Pinto		
Instituição:	UFLA	Nível:	Graduado
Laboratório:	Fisiologia e farmacologia Veterinária	Função:	Executante
Telefone:	33117460	Ramal:	
Calular:	+55 32 9174-3769	e-mail:	daniellecinep@gmail.com

22	COL5	13,50	45,70	5.	Diarreia liquida	<i>E.coli</i> (3)	29/4	STEC/ET EC
	48-1				Diarreia			
48	COL5	13,50	36,30	5.	Pastosa	<i>E.coli</i> (2)	26/4	EPEC
	90-1				Diarreia			
90	COL11	13,50	34,70	11.	Liquida	<i>E.coli</i> (2)	4/5	STEC/ET EC