

## Resposta imunológica de vacas leiteiras expostas ao estresse térmico

### Immune response of dairy cows exposed to heat stress

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a concentração de leucócitos totais e linfócitos de vacas leiteiras em estresse térmico suplementadas com diferentes doses de astaxantina. As amostras foram coletadas via punção da veia caudal e as células foram quantificadas utilizando câmara de Neubauer e classificadas através de corante panótico. Foi observado que o antioxidante, na dose de 0,25 mg/ kg peso vivo/ dia, aumentou significativamente a mobilização dos leucócitos totais e linfócitos a partir do 42º dia de suplementação, sendo estes resultados acima dos valores hematológicos de referência descritos na literatura para a espécie. A dose de 0,50 mg/ kg peso vivo/ dia, no entanto, não influenciou no recrutamento destas células. Por fim, conclui-se que a menor concentração de astaxantina estimulou, ao longo da suplementação, o sistema imune das vacas leiteiras, enquanto a maior concentração obteve resultados próximos aos encontrados no grupo controle.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resposta imune. Antioxidantes. Bovinos de leite.

#### ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the concentration of total leukocytes and lymphocytes of dairy cows under heat stress supplemented with different doses of astaxanthin. The samples were collected via puncture of the caudal vein and the cells were quantified using the Neubauer chamber and qualified using panotic dyes. It was observed that the antioxidant, at a dose of 0.25 mg / kg live weight / day, significantly increased the mobilization of total leukocytes and lymphocytes from the 42nd supplementation, these results being above the hematological reference values described in the literature. The dose of 0.50 mg / kg body weight / day, however, did not influence the recruitment of these cells. Finally, it is concluded that the lowest concentration of astaxanthin stimulated, during supplementation, the immune system of dairy cows, while the highest concentration obtained results close to those found in the control group.

**KEYWORDS:** Immune response. Antioxidants. Dairy cattle.

**Matheus Luquirini Penteado dos Santos**  
[matheus.luquirini@gmail.com](mailto:matheus.luquirini@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Flavia Regina Oliveira de Barros**  
[flaviabarros@utfpr.edu.br](mailto:flaviabarros@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Rafael Arcenio da Costa**  
[rafaeldacosta11@hotmail.com](mailto:rafaeldacosta11@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Wellington Fernando de Almeida**  
[wfa.zootecnia@gmail.com](mailto:wfa.zootecnia@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Bruno Ramos**  
[b-henrique24@hotmail.com](mailto:b-henrique24@hotmail.com)  
Centro Universitário da Região da Campanha, Alegrete, Rio Grande do Sul, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

As vacas de raças europeias são, em geral, responsáveis pela maior produção de leite globalmente. Entretanto, por serem geneticamente mais adaptadas para viver em ambientes temperados, sua produtividade é duramente afetada quando estas passam a ser criadas em regiões tropicais devido às altas temperaturas (SILVA et al., 2002). O estresse térmico (HS, do inglês *heat stress*), causado pela variação de temperatura, umidade do ar, período produtivo entre outros (FAGAN et al., 2010), somado ao alto metabolismo do animal, provoca desregulações fisiológicas, comportamentais e imunológicas no gado leiteiro (AZEVEDO; ALVES., 2009). Tal estresse reduz 17% da produtividade em animais de 15 kg de leite/ dia e 22% da produtividade de animais de 40 kg de leite/ dia (PINARELLI, 2003).

A longa exposição do animal ao HS estimula a ativação de várias vias metabólicas, dentre elas o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O HPA, cuja função é manter a homeostase do meio interno, coordena as reações fisiológicas do corpo quando este é submetido a diferentes tipos de estresse (SEJIAN et al., 2018). Um dos mecanismos de controle do HS é o aumento da produção de cortisol, um hormônio com propriedades anti-inflamatórias comumente associado com a supressão do sistema imunológico. O aumento da concentração de cortisol plasmático ocasiona na diminuição do recrutamento de células do sistema imune (leucócitos), principalmente os linfócitos, deixando os animais mais suscetíveis a bactérias, vírus e parasitas (GRANDIN, 1997; MCGREGOR et al., 2016).

Dentre as alterações que o HS e o excesso de cortisol provocam no organismo, destacam-se o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Estas moléculas provocam modificações em estruturas celulares dos organismos vivos através da captura de prótons de diversas biomoléculas (BERTOUT et al., 2004). Para manter a homeostase do meio interno, as células produzem moléculas denominadas antioxidantes, cuja função é fornecer prótons para as ROS a fim de neutralizá-las (BROWN et al., 2018). A astaxantina é um antioxidante carotenoide, obtido através de microalgas, vertebrados e invertebrados marinhos (GALASSO; CORINALDESI; SANSONE, 2017), amplamente utilizado no mercado para o combate de ROS. Em estudos recentes, a astaxantina apresentou papel de regulador de estresse oxidativo e inflamação e estimulador de respostas imunes inata, mediada por célula e humoral (CHEW et al., 2011; PARK et al., 2011). Atualmente, vários trabalhos procuram utilizar a astaxantina como suplementação para animais e, através disto, combater os efeitos fisiológicos causados pelo HS (KUMAR; SINGH, 2019, 2020; SOMAGOND; SINGH; DESHPANDE, 2019).

Desta forma, o atual trabalho possui o objetivo de avaliar os efeitos da astaxantina na mobilização de leucócitos totais e linfócitos em vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vacas leiteiras híbridas (*Bos taurus taurus*; n = 45; idade média: 5,22 anos;  $\pm$  550 kg peso vivo) foram suplementadas diariamente, via oral, com diferentes concentrações de astaxantina (0; 0,25 ou 0,50 mg astaxantina/ kg peso vivo/ dia) durante 56 dias de experimentação em meses quentes (Janeiro a Março, n = 15

por grupo). Amostras de sangue foram coletadas a cada 14 dias a partir do início da suplementação para realização de leucograma e quantificação de cortisol e astaxantina sérica, totalizando seis coletas na estação verão. Tais amostras foram coletadas por punção da veia caudal e acondicionadas em tubos de ensaio contendo citrato de sódio 3,2% (m/v), mantendo a proporção de 1:10, (citrato: sangue). Os tubos foram acomodados em gelo até a análise em laboratório.

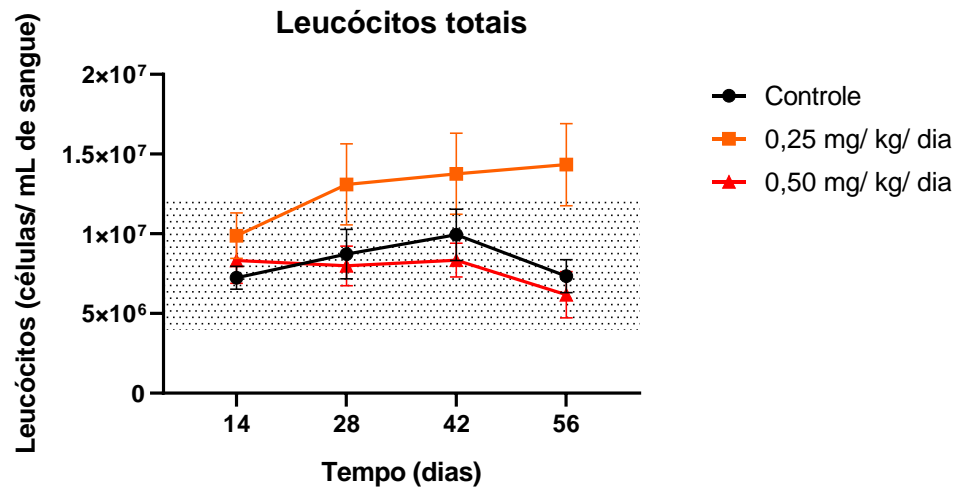
Para a análise morfológica, foi preparado um esfregaço de uma gota de sangue de aproximadamente 20 µL em lâmina de microscopia. As lâminas contendo o esfregaço foram secas em chapa de aquecimento a 37 °C, coradas por corante panótico (triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%) (Newprov, PA186) e lavadas em água destilada. A análise morfológica dos leucócitos foi realizada por microscopia óptica, utilizando a lente objetiva de 100x em imersão (Laborclin, 98698). A contagem das células foi feita pelo aplicativo *Haematological Cell Counter (RBC/WBC Counter)* (Sebastian Sleiman, 2.8©). A análise quantitativa foi realizada através da Câmara de Neubauer utilizando líquido de Türk 4% (m/v) na proporção de 1:20 (sangue: líquido de Türk).

Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal e homogeneidade das variâncias antes de serem analisados por ANOVA de duas vias, considerando o fatorial 3 x 4 [variável independente Astaxantina com três níveis x variável independente Tempo com quatro níveis (amostras repetidas no tempo)]. Foram verificados efeito de Astaxantina, Tempo e interação Astaxantina x Tempo. Para comparação entre os grupos foi utilizando o pós-teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Dados não paramétricos foram transformados utilizando a função raiz quadrada e submetidos à ANOVA de duas vias. Dados que mesmo após transformação não atenderam às premissas para análise de variância foram analisados utilizando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparação entre grupos, também utilizando um nível de significância de 5%. Foram consideradas variáveis dependentes: leucócitos totais e linfócitos totais. Para melhor dissecar o efeito do tempo sobre as variáveis dependentes e remover qualquer fator de confusão na resposta observada, foi realizada uma segunda análise dos dados normalizados pela resposta do grupo controle para cada ponto no tempo. A análise estatística e a confecção dos gráficos foi realizada com auxílio do software Prism GraphPad versão 7.0 para MacOS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação com astaxantina surtiu efeito significativo na mobilização de leucócitos totais nas vacas tratadas (Astaxantina:  $p=0,0304$ ). Na figura 1, percebe-se uma tendência de aumento da concentração de células no segundo grupo (0,25 mg/ kg/ dia) no dia 28. Entretanto, é apenas no dia 56 que esse crescimento apresenta diferença estatística dos demais grupos ( $p=0,0310$  para o controle e  $p=0,0022$  para o terceiro grupo). O tratamento com a menor dose de Astaxantina também promoveu uma mobilização média de células acima dos valores de referência hematológicos descritos na literatura (dias 28, 42 e 56) (MERCK, 2015).

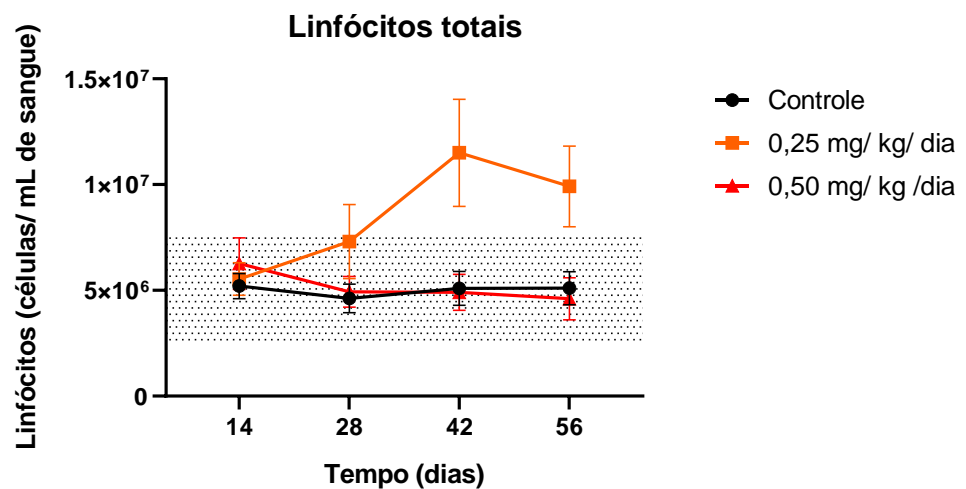
Figura 1 – Mobilização de leucócitos totais ao longo da suplementação com astaxantina



Fonte: Autoria própria (2020)

Os resultados da análise de linfócitos (Figura 2) seguiram padrão similar ao dos resultados apresentados na figura 1. Novamente, o segundo grupo (0,25 mg de Astaxantina/ kg/ dia) apresentou diferença estatística significativa do grupo controle e do terceiro grupo nos dias 42 ( $p=0,0179$  e  $p=0,0112$ ) e 56 ( $p=0,0412$  e  $p=0,0161$ ). Nestes dias, ainda no segundo grupo, foi observado uma considerável variação no recrutamento de linfócitos quando comparados ao dia 14 ( $p=0,0014$  e  $p=0,0137$  para os dias 42 e 56, respectivamente), sendo este recrutamento superior aos valores de referência hematológicos descritos na literatura (MERCK, 2015). Semelhantemente à figura 1, houve influência da Astaxantina sobre o aumento da concentração de linfócitos ( $p=0,0440$ ). Entretanto, neste caso, também houve influência da interação entre as variáveis independentes (Tempo e Astaxantina) na mobilização das células ( $p=0,0239$ ).

Figura 2 – Mobilização de linfócitos ao longo da suplementação com astaxantina

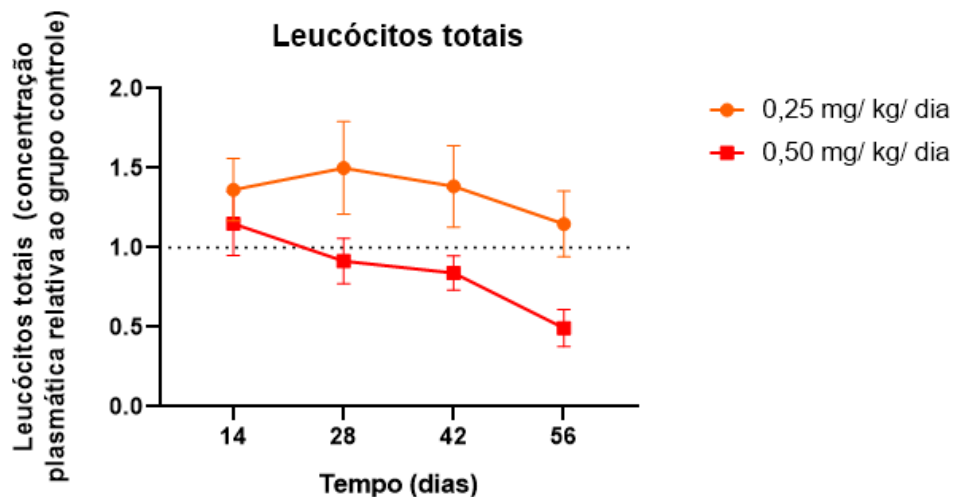


Fonte: Autoria própria (2020)



Os resultados obtidos descritos nas figuras 1 e 2 permitem uma compreensão geral sobre a mobilização das células no organismo das vacas. Entretanto, estas figuras não oferecem uma perspectiva clara sobre o efeito da suplementação da astaxantina quando comparado ao grupo controle. Desta forma, a fim de remover qualquer fator de confusão no modelo, optou-se pela normalização dos dados obtidos referente ao grupo controle para melhorar a visualização da disparidade entre os grupos e eliminar quaisquer variáveis não relacionadas ao experimento. Assim, a partir da normalização dos resultados dos leucócitos totais (Figura 3), pôde-se observar um declínio acentuado na concentração de células relativas ao grupo controle com a dose de 0,50 mg/ kg/ dia, havendo variação estatística do dia 14 com os dias 28, 42 e 56 ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0021$  e  $p = 0,0089$ , respectivamente). No dia 56, ainda, houve uma significativa diferença na quantidade de células entre os dos dois grupos do tratamento ( $p = 0,0024$ ). Para os leucócitos totais, notou-se que houve influência das duas variáveis independentes (tempo e astaxantina,  $p = 0,0014$  e  $p = 0,0337$ , respectivamente) e da interação entre elas ( $p = 0,0225$ ).

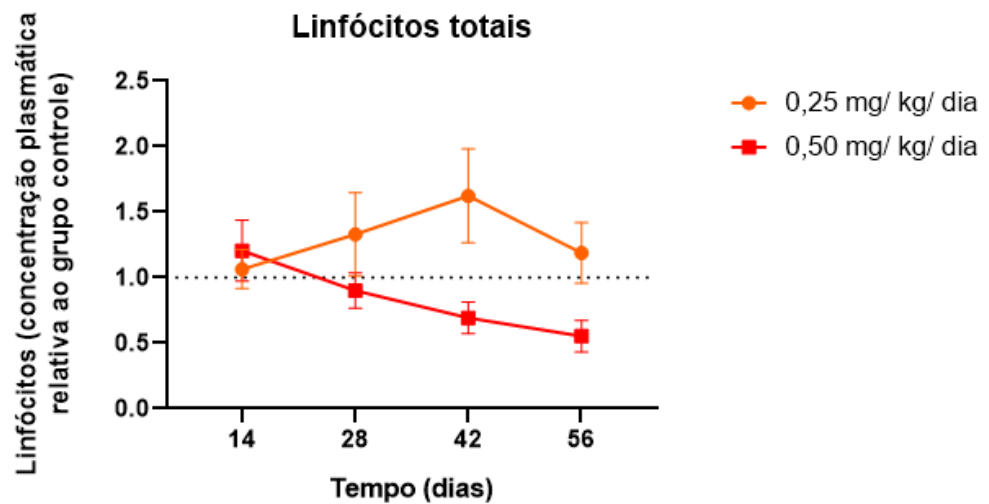
Figura 3 – Concentração plasmática de leucócitos totais relativas ao grupo controle durante a suplementação com astaxantina



Fonte: Autoria própria (2020)

Na figura 4, gerada a partir da normalização dos dados dos linfócitos, é possível perceber um decréscimo constante na mobilização das células no grupo de 0,50 mg/ kg/ dia, quando comparado com o controle (linha pontilhada). Dentro deste grupo, houveram variações estatísticas significativas entre os dias 14 e 42, 14 e 56, e 28 e 56 ( $p = 0,0203$ ,  $p = 0,0002$  e  $p = 0,0459$ , respectivamente), o que comprova a queda na taxa de linfócitos circulantes. Notou-se também, diferenças entre os grupos com menor e maior dose de astaxantina nos dias 42 ( $p = 0,0080$ ) e 56 ( $p = 0,0227$ ). Semelhante à figura 3, notou-se influência da interação entre o tempo e a astaxantina ( $p = 0,0060$ ) para esta análise.

Figura 4 – Concentração plasmática de linfócitos relativos ao grupo controle durante a suplementação com astaxantina



Fonte: Autoria própria (2020)

Em estudos realizados em camundongos (LIN et al., 2015) foi revelado que a astaxantina aumentou a viabilidade celular dos linfócitos *in vitro* e mantendo-a constante *in vivo*, comprovando que o antioxidante não é citotóxico para as células. O experimento com as vacas holandesas apresentou um resultado semelhante, uma vez que não houve variação estatística entre a concentração de linfócitos na dose de 0,50 mg/ kg/ dia e a concentração de linfócitos no grupo controle. Nesta pesquisa, ainda, foi observado que o segundo grupo (0,25 mg/ kg/ dia), em geral, apresentou uma maior mobilização das células do que os outros grupos previamente citados, provando que a astaxantina, além de não ser tóxica para as células, ainda aumenta sua concentração plasmática.

Em um trabalho realizado com gatos domésticos (PARK et al., 2011) e com cachorros (CHEW et al., 2011) mostraram que a astaxantina não influenciou no recrutamento de granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e de monócitos. Entretanto, para gatos, foi relatado que o antioxidante provocou aumento na concentração de linfócitos T CD4+ e T CD8+, apesar de ter reduzido a população de linfócitos T totais. Para cachorros, no entanto, a astaxantina provocou um crescimento na população de linfócitos B e não influenciou na população total de linfócitos T. Estudos futuros são necessários para verificar a mobilização das subpopulações de linfócitos de vacas leiteiras quando estas forem suplementadas com astaxantina.

## CONCLUSÃO

Animais que foram identificados, ao longo do experimento, com enfermidades de origem patológica tiveram seus dados retirados da análise estatística a partir do dia do diagnóstico. O segundo grupo (0,25 mg astaxantina/ kg/ dia) mostrou um maior potencial no recrutamento de células do sistema imunológico (leucócitos totais e linfócitos) quando comparado ao terceiro grupo (0,50 mg astaxantina/ kg/ dia) e ao grupo controle, sendo este resultado observado a partir da terceira

semana de suplementação. Ainda neste grupo, foi observado uma concentração de leucócitos e linfócitos acima dos valores de referência descritos na literatura.

A partir da análise das figuras, pode-se concluir que os resultados não foram imediatos, sendo necessário algumas semanas para que a suplementação surgisse efeito. Foi observado que a dose do terceiro grupo obteve uma taxa de recrutamento de leucócitos e linfócitos, em geral, semelhante ao grupo controle. Ademais, para análises futuras, pretende-se quantificar a astaxantina plasmática a fim de avaliar o grau de metabolização do antioxidante no organismo e, ainda, quantificar a concentração de cortisol no plasma para o estudo da interação entre o cortisol e o sistema imunológico sob influência da astaxantina.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a fazenda CECCON por ceder 45 vacas para a realização deste experimento, os alunos de graduação Victor Gabriel Pastre, Luciane Xavier, Danieli Cuchi, Lucas Michel, Deborah Lizama, Cecília Dammann, Nicholas Luquirini dos Santos, Miriam Domingues Guimarães, a aluna da pós-graduação Izabel Gogone e o médico veterinário Neilson Figueiredo.

### REFERÊNCIAS

AZEVEDO, D. M. M. R.; ALVES., A. A. Bioclimatologia Aplicada à Produção de Bovinos Leiteiros nos Trópicos. **Embrapa Meio Norte**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/664507/bioclimatologia-aplicada-a-producao-de-bovinos-leiteiros-nos-tropicos>. Acesso em: 24 ago. 2020.

BERTOOUT, J. A. et al. Reactive Oxygen Species and Ovarian Function. In: **The Ovary**. 2. ed. Elsevier, 2004. p. 353–368. Acesso em: 20 ago. 2020.

BROWN, D. R. et al. Astaxanthin in Exercise Metabolism, Performance and Recovery: A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 4, n. January, p. 1–9, 18 jan. 2018. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2017.00076/full>. Acesso em: 20 ago. 2020.

CHEW, B. P. et al. Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 140, n. 3–4, p. 199–206, abr. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.12.004>. Acesso em: 21 ago. 2020.

FAGAN, E. P. et al. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química do leite em granjas leiteiras do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 309–316, 3 set. 2010. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/8570>. Acesso em: 24 ago. 2020.

GALASSO, C.; CORINALDESI, C.; SANSONE, C. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 96, 23 nov. 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-3921/6/4/96>. Acesso em: 20 ago. 2020.

GRANDIN, T. Assessment of Stress during Handling and Transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 249–257, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/75/1/249-257/4637218>. Acesso em: 29 ago. 2020.

KUMAR, S.; SINGH, S. V. Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway by astaxanthin supplementation for prevention of heat stress–induced inflammatory changes and apoptosis in Karan Fries heifers. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1125–1134, 5 jun. 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11250-018-01793-y>. Acesso em: 21 ago. 2020.

KUMAR, S.; SINGH, S. V. Influence of astaxanthin supplementation on attainment of puberty and lipid peroxidation in Sahiwal and Karan Fries (Holstein  $\times$  Tharparkar) heifers during summer season. **Biological Rhythm Research**, v. 51, n. 1, p. 15–28, 2 jan. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09291016.2018.1512298>. Acesso em: 20 ago. 2020.

LIN, K.-H. et al. Astaxanthin, a Carotenoid, Stimulates Immune Responses by Enhancing IFN- $\gamma$  and IL-2 Secretion in Primary Cultured Lymphocytes in Vitro and ex Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 44, 29 dez. 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/44>. Acesso em: 22 ago. 2020.

MCGREGOR, B. A. et al. Stress, cortisol, and B lymphocytes: a novel approach to understanding academic stress and immune function. **Stress**, v. 19, n. 2, p. 185–191, 3 mar. 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253890.2015.1127913>. Acesso em: 21 ago. 2020.

MERCK. **Hematologic Reference Ranges**. Disponível em: <https://www.merckvetmanual.com/special-subjects/reference-guides/hematologic-reference-ranges>. Acesso em: 28 jan. 2020. Acesso em: 29 ago. 2020.

PARK, J. S. et al. Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 3–4, p. 455–461, dez. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.019>. Acesso em: 22 ago. 2020.



PINARELLI, C. The effect of heat stress on milk yield. **Latte**, v. 28, p. 36–38, 2003. Acesso em: 24 ago. 2020.

SEJIAN, V. et al. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v. 12, n. s2, p. s431–s444, 24 dez. 2018. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118001945/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118001945/type/journal_article). Acesso em: 23 ago. 2020.

SILVA, I. J. O. da et al. Efeitos da climatização do curral de espera na produção de leite de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 2036–2042, set. 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982002000800019&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982002000800019&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 24 ago. 2020.

SOMAGOND, Y. M.; SINGH, S. V.; DESHPANDE, A. Effect of dietary supplementation of astaxanthin, prill fat and combination on stress indicators, milk yield and composition during heat stress in buffaloes. **Biological Rhythm Research**, p. 1–11, 26 ago. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09291016.2019.1658426>. Acesso em: 22 ago. 2020.