KARINA MEDICI MADUREIRA

Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva

São Paulo
2011

KARINA MEDICI MADUREIRA

Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Fernando José Benesi

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

20/12/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2532
FMVZ

Karina Medici Madureira

Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas
bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade
passiva / Karina Medici Madureira. -- 2012.
106 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Citocinas. 2. Colostro. 3. Sangue. 4. Fagócitos. 5. Imunidade Passiva.
I. Título.

ERRATA

MADUREIRA, K. M. Concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva. 2011. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º	Concentração das citocinas	Citocinas ...
Abstract	1º	Concentration of cytokines	Cytokines...

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo das citocinas do colostro e do sangue de vacas holandesas e seus conceitos. Efeito da *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET) sobre os fagócitos", protocolado sob o nº 2194/2011, utilizando 30 (trinta) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fernando José Benesi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Study of colostrum and blood cytokines in Holstein cows and calves. Effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ECET) on phagocytes", protocol number 2194/2011, utilizing 30 (thirty) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Fernando José Benesi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MADUREIRA, Karina Medici

Título: Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Dedico este trabalho...

*À minha amada família:
Meus pais, Rui e Dennise, pelo amor incondicional,
pelo exemplo de vida, de caráter e por sempre me
mostrarem o caminho;*

*Meu querido irmão Caio, por seus ensinamentos
inconscientes de amor ao próximo e a me mostrar
como ser uma pessoa melhor.*

*Ao meu amado marido Rodrigo, que aceitou sempre
todos os meus momentos de ausência, além do apoio
e por todas as vezes que me ouviu e me aconselhou e
que foram fundamentais para que eu pudesse seguir
em frente.*

Agradecimentos

À Deus, que me abençoa e me fortalece todos os dias;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando José Benesi, por toda a ajuda e conselhos não somente relacionados á este trabalho, mas sobre a vida também.

À amiga e Profa. Dra. Viviani Gomes, fundamental na minha vida. Agradeço todos os dias por tê-la em meu caminho! Você é muito importante para mim.

À Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, minha professora da graduação e que me ensinou os primeiros passos..... exemplos de pessoa e de profissional a serem seguidos e admirados.

Ao Prof. Dr. Maurício Garcia, meu professor da graduação e responsável por despertar em mim o interesse pela pesquisa.

À Dra. Gerlândia Neres Pontes, por todos os ensinamentos e acima de tudo por toda paciência e atenção.

Ao veterinário Sérgio Soriano e toda a equipe da Fazenda Colorado, em especial a equipe da maternidade e sala de ordenha, que não mediram esforços para que eu pudesse finalizar esta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Ciências da Saúde do Centro Universitário Anhanguera, Renata, Heros, Sergio, Fernanda, Elton e Jairo, pela eficiente ajuda no preparo e limpeza dos materiais utilizados na colheita.

Aos queridos ex-alunos Evaldo Aparecido Dias da Rosa, Gisele Fernanda Gregghi, Públio Domingues, Tarcísio Macedo Silva e Tatiana Ranieri, que perderam noites de sono e enfrentaram o frio na Fazenda para me ajudar nas colheitas. Sinto muitas saudades!

Ao doutorando Rogério Batista, aos acadêmicos Vinícius Dayoub Gonçalves e Raquel Marques e às veterinárias Carolina Harumi Seino e Juliana Bombardelli por toda a ajuda com o preparo dos materiais e durante o processamento das amostras, e especialmente, à mestranda Carolina Lara Shecaira, pela ajuda madrugadas afora no laboratório e pela companhia nas viagens para as colheitas do colostro.

À equipe “BVD”, Camila Ramos e Cynthia Pereira da Costa e Silva, por todo o apoio e alto astral que demonstraram, até nos momentos mais difíceis.

Aos professores doutores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP: Archivaldo Reche Junior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Cássio Xavier de Mendonça Junior (in memorian), Denise Saretta Schwartz, Enrico Lippi Ortolani, Fábio Celidonio Pogliani, Lilian Gregory, Marcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Maria Cláudia

Araripe Sucupira, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Baccarin Silvia Regina Ricci Lucas, Wandereley Pereira de Araújo (in memorian), Wilson Roberto Fernandes, pelos ensinamentos e convivência de todos estes anos.

À técnica do laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica, Cláudia Regina Stricagnolo, pela paciência, ajuda e persistência na padronização e utilização dos kits de Elisa. Não teria conseguido sem sua ajuda!

Às técnicas dos laboratórios do Departamento de Clínica Médica Clara Satsuki Mori e Samantha Miya, por toda a ajuda vinda sempre com muita boa vontade.

À Profa. Dra. Juliana Peiró, por toda atenção e preocupação em esclarecer minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Paulo Ferreira de Matos, por compreender e aceitar minha ausência nas aulas, nos momentos de finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Humberto Hamad Minervino, pela ajuda na estatística dos resultados obtidos neste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Clínica Médica, Maria Aparecida de Freitas, Silvana Rossi Guedes e Carolina Arais Aroma e da Pós-graduação, Adelaide Fátima de Jesus Borges, por todas as informações prestadas pertinentes à concretização desta tese.

À funcionária Dinha, pelo auxílio com a limpeza dos materiais utilizados no experimento.

À FAPESP, por conceder o Auxílio à Pesquisa número 2009/ 10394-0.

RESUMO

MADUREIRA, K. M. **Concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva.** [Concentration of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ in blood and colostrum of Holstein cows. Importance in the immune passive transfer]. 2011. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O colostro bovino contém fatores imunológicos, como imunoglobulinas, leucócitos e citocinas, absorvidos pela mucosa intestinal do neonato até 48 horas de vida, no entanto, pouco se conhece sobre a função de alguns desses componentes, como as citocinas, participantes da resposta imune inata e adaptativa. Acredita-se que estas substâncias possuem papel importante na imunidade dos neonatos nos seus primeiros dias de vida. Assim, os objetivos específicos desta pesquisa foram: determinar as concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa; verificar a liberação de citocinas pelas células mononucleares do colostro e sangue bovino “*in vitro*” antes e após a estimulação com *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET); avaliar a transferência das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α do colostro aos bezerros neonatos, por meio da determinação das concentrações destas citocinas no soro sanguíneo dos bezerros, durante os quinze primeiros dias de vida. O trabalho foi realizado em duas etapas, em duas propriedades distintas: (1) avaliação do soro sanguíneo e colostro de primeira ordenha proveniente de 22 fêmeas; (2) avaliação das citocinas sanguíneas de 11 bezerros, antes e após a mamada de colostro. Nesta pesquisa foi possível determinar as medianas da concentração de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no colostro bovino e soro sanguíneo, correspondente a 70,5 e 41,5; 86,1 e 13,5; 41 e 57,9; 139,9 e 20,8 pg/mL, respectivamente, verificando menores valores de IFN- γ no colostro e TNF- α e IL-6 no soro sanguíneo. Observou-se diferença entre as citocinas no colostro e soro sanguíneo para a TNF- α . Observou-se produção de

citocinas pelas células do colostro e sangue das mães mediante liberação espontânea e pela ECET com tendência ao aumento dessa produção entre os períodos de incubação celular e pela estimulação com ECET. A avaliação do soro dos bezerros mostrou ausência das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α antes da ingestão de colostro, que atingiram pico após 48 horas de vida. Os valores médios das concentrações de citocinas presentes no soro das vacas e novilhas foram de 98,3; 88,4; 53,5 e 235,9 pg/mL e 144,5; 94,5; 83,9 e 116,2 pg/mL, para IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , respectivamente. Os valores médios das concentrações de citocinas (pg/mL) presentes no colostro das vacas e novilhas foram de 97,4; 21,3; 143,3 e 35,1 pg/mL e 69,5; 6,4; 51,9 e 16,32 pg/mL, para as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , respectivamente. Quando se comparou os dois grupos analisados verificou-se que os valores médios de IFN- γ e TNF- α foram significativamente maiores nas vacas. Assim, com base nos resultados desta pesquisa foi possível: (a) determinar a concentração de citocinas do soro sanguíneo e colostro de fêmeas bovinas; (b) verificar a produção de citocinas pelas células do soro e colostro das vacas, verificando-se diferentes perfis nestas duas regiões; (c) verificar a absorção das citocinas do colostro pelo neonato bovino; (d) verificar que as vacas possuem maiores concentrações de citocinas IFN- γ e TNF- α no colostro, quando comparadas às novilhas; (e) não há diferenças entre a concentração das citocinas do colostro obtidas em diferentes quartos mamários.

Palavras-chave: Citocinas. Colostro. Sangue. Fagócitos. Imunidade Passiva.

ABSTRACT

MADUREIRA, K. M. **Concentration of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ in blood and colostrum of Holstein cows. Importance in the immune passive transfer** [Concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva] 2011. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Bovine colostrum contains immunological factors, such as immunoglobulins, leukocytes and cytokines, which are absorbed by the intestinal mucous membrane of the neonate up to 48 hours of life. However, little is known about the function of some of these components, such as cytokines, which take part in innate and adaptive immune responses. It is believed that these substances have important roles in neonate immunity on their first days of life. Therefore, the specific objectives of this study were: to determine the concentration of cytokines IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α in serum and colostrum of Holstein cows; to assess the *in vitro* release of cytokines by mononuclear cells of colostrum and blood before and after stimulation with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ECET); to evaluate IL-1 β , IL-6 and TNF- α transfer from colostrum to neonate calves by determining cytokine concentrations in calf blood during the first 15 days of life. The study was carried out in two stages, in different farms: (1) evaluation of blood and first milking colostrum in 22 females; (2) evaluation of blood cytokines of 11 calves, before and after colostrum intake. In this study, it was possible to determine the medians of IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α concentration in blood and colostrum as equal to 70.5 and 41.5; 86.1 and 13.5; 41 and 57.9; 139.9 and 20.8 pg/mL, respectively. The lowest values of IFN- γ were observed in colostrum, and of TNF- α and IL-6, in serum. TNF- α concentration was different in serum and in blood. It was observed colostrum and blood cells of the cows produced cytokines spontaneously and by means of ECET, with a tendency to increase production in periods of cell incubation and stimulation with ECET. Evaluation of calf serum showed absence

of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α before colostrum ingestion, and these cytokines reached a peak after 48 hours of life. Mean values for cytokine concentration in the serum of cows and heifers were 98.3; 88.4; 53.5 and 235.9 pg/mL, and 144.5; 94.5; 83.9 and 116.2 pg/mL, for IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α , respectively. Mean values for cytokine concentration in the colostrum of cows and heifers were 97.4; 21.3; 143.3 and 35.1 pg/mL, and 69.5; 6.4; 51.9 and 16.32 pg/mL, for IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α , respectively. When the two groups were analyzed, it was observed that mean de IFN- γ and TNF- α were significantly greater in the cows. Thus, based on the results of this study, it was possible to: (a) determine the concentration of cytokines in serum and colostrum of cows; (b) assess cytokine production by cells of cow serum and colostrum, observing different profiles in the two samples; (c) observe cytokine absorption from colostrum by the calves; (d) assess that cows show greater concentrations of IFN- γ and TNF- α in the colostrum, when compared with heifers; (e) that there are no differences between cytokine concentrations observed in the different quarters.

Keywords: Cytokines. Colostrum. Blood. Phagocytes. Passive immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema simplificado do processo inflamatório e produção de citocinas, adaptado de Doan et al. (2008).....	46
Figura 2 -	Galpão das fêmeas bovinas no período pré-parto, sistema “free-stall” em propriedade de leite tipo A utilizada na primeira etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.....	52
Figura 3 -	Piquete maternidade, localizado no interior do galpão identificado na Figura 2, em propriedade de leite do tipo A utilizada na primeira etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.....	52
Figura 4 -	Sala de ordenha da Fazenda produtora de leite tipo A, São Paulo, 2011.....	52
Figura 5 -	Separação dos fagócitos mononucleares do sangue de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	57
Figura 6 -	Fagócitos presentes no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. As células viáveis são as que não foram impregnadas pelo corante Azul de Tripán, São Paulo, 2011.....	60
Figura 7 -	Esquema de preenchimento da placa de cultivo celular de 24 poços, contendo as suspensões celulares, antes dos primeiros 60 minutos de incubação, São Paulo, 2011.....	63
Figura 8 -	Esquema de preenchimento da placa de cultivo celular de 24 poços, contendo a suspensão bacteriana (ECET), antes dos 120 minutos de incubação, São Paulo, 2011.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	69
Tabela 2 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	71
Tabela 3 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e sobrenadante de colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	72
Tabela 4 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sangue de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.....	73
Tabela 5 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.....	75
Tabela 6 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os quartos mamários, São Paulo, 2011.....	76
Tabela 7 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas (pg/mL) IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com o número da lactação, São Paulo, 2011.....	78
Tabela 8 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas (pg/mL) IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com o número de lactações, São Paulo, 2011.....	79

Tabela 9 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	81
Tabela 10 -	Valores medianos das concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro sanguíneo dos bezerros neonatos, de acordo com os tempos das colheitas relacionados às idades dos animais, São Paulo, 2011.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Porcentagens de amostras positivas e negativas ao exame bacteriológico do colostro bovino utilizado na primeira etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.....	68
Gráfico 2 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	70
Gráfico 3 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	71
Gráfico 4 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e sobrenadante de colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	72
Gráfico 5 -	Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sangue de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.....	74
Gráfico 6 -	Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.....	75
Gráfico 7 -	Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de vacas e novilhas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	78
Gráfico 8 -	Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de vacas e novilhas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	79
Gráfico 9 -	Porcentagens de amostras positivas e negativas ao exame bacteriológico do colostro bovino utilizado na segunda etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.....	80
Gráfico 10 -	Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.....	81

Gráfico 11 -	Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro sanguíneo de bezerros neonatos, de acordo com os tempos das colheitas, São Paulo, 2011.....	83
--------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Con-A	Concanavalina-A
ELISA	Ensaio imonossorvente ligado à enzima (do inglês: <i>Enzyme linked Imuno Sorbet Assay</i>)
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
T $\gamma\lambda$	Linfócitos T gama-delta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
T $\alpha\beta$	Linfócitos T alfa-beta
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
D.O	Densidade óptica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
g/G	Força gravitacional
mL	Mililitros
ng	Nanograma
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	SISTEMA IMUNE DO BEZERRO NEONATO.....	27
2.2	CÉLULAS DO COLOSTRO BOVINO.....	31
2.3	CITOCINAS.....	34
2.3.1	Interleucina 1- β (IL-1 β).....	35
2.3.2	Interleucina 6 (IL-6).....	36
2.3.3	Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	37
2.3.4	Interferon- γ (IFN- γ).....	39
2.4	PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS DO COLOSTRO NA IMUNIDADE NEONATAL.....	41
2.5	PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS FAGÓCITOS DO COLOSTRO.....	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	48
3.2	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS.....	49
3.3	ALIMENTAÇÃO E MANEJO GERAL DOS ANIMAIS.....	50
3.4	COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	53
3.5	COLHEITA DAS AMOSTRAS DE COLOSTRO DAS FÊMEAS BOVINAS.....	54
3.6	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	55
3.6.1	Exame microbiológico do colostro.....	55

3.6.2	Obtenção do soro sanguíneo das fêmeas e bezerros neonatos e separação dos fagócitos mononucleares do sangue das fêmeas bovinas.....	56
3.6.3	Obtenção do sobrenadante e separação dos fagócitos do colostro bovino.....	58
3.6.4	Avaliação da viabilidade e ajuste do número de células presentes no sangue e colostro bovino.....	59
3.6.5	Preparação do extrato e padronização da concentração bacteriana.....	60
3.6.6	Obtenção do sobrenadante celular do sangue e colostro das fêmeas bovinas, após estimulação dos fagócitos com ECET.....	61
3.6.7	Efeito da Escherichia coli sobre os fagócitos presentes no sangue e colostro das fêmeas bovinas.....	64
3.6.8	Determinação das concentrações de citocinas.....	64
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
5	RESULTADOS.....	67
5.1	PRIMEIRA ETAPA.....	68
5.1.1	Citocinas presentes no soro sanguíneo das fêmeas bovinas.....	69
5.1.2	Citocinas presentes no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas.....	70
5.1.3	Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo de fagócitos mononucleares do sangue das fêmeas bovinas.....	73
5.1.4	Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo de fagócitos do colostro das fêmeas bovinas.....	74
5.1.5	Relação entre as citocinas do sobrenadante do colostro e os quartos mamários.....	76
5.1.6	Relação entre as citocinas do soro sanguíneo e sobrenadante do colostro com o número da lactação.....	77
5.2	SEGUNDA ETAPA.....	80

5.2.1	Citocinas presentes no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas.....	81
5.2.2	Citocinas presentes no soro sanguíneo dos bezerros neonatos.....	82
6	DISCUSSÃO.....	84
6.1	Citocinas presentes no soro sanguíneo e sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas.....	85
6.2	Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo celular de fagócitos mononucleares do sangue e colostro das fêmeas bovinas.....	89
6.3	Relação entre as citocinas do soro sanguíneo e sobrenadante do colostro e o número da lactação.....	92
6.4	Citocinas presentes no soro sanguíneo dos bezerros neonatos.....	94
7	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

Neonatos bovinos são imunologicamente enfraquecidos ao nascimento, em virtude de permanecerem, durante a gestação, em um ambiente estéril, impermeável e protetor oferecido pelo útero, dificultando o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa após experiências prévias com patógenos e uma limitada ativação dos fagócitos e sua entrada nos tecidos, tornando-os susceptíveis aos agentes causadores de infecção durante este período de “janela imunológica”, principalmente nas quatro primeiras semanas de vida (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Neste período, portanto, a assistência materna é fundamental á sobrevivência do neonato, garantida pela transferência de imunidade passiva através do colostro.

Muitos trabalhos foram realizados identificando a importância do fornecimento do colostro bovino no período neonatal, em virtude de tal alimento possuir um perfil nutricional e imunológico diferente do leite e por ser responsável por fornecer ao bezerro neonato macronutrientes, vitaminas e minerais; fatores imunes tais como imunoglobulinas, leucócitos e citocinas, fatores de crescimento; lactoperoxidase, lactoferrina e outros componentes antimicrobianos (PAAPE et al., 1991; SORDILLO; SHAFFER-WEAVER; DeROSA et al., 1997; BOUTINAUD; JAMMES, 2002; PAAPE et al., 2002; KELLY, 2003; RAINARD; RIOLLET, 2006; STELWAGEN et al., 2009), até que o recém-nascido seja capaz de produzi-los.

Outros trabalhos enfatizam ainda a importância da utilização do colostro bovino no controle de infecções em outras espécies, como a influenza (SHING NG, 2010), rotavírose (INAGAKI et al., 2010) e colibacilose em humanos (OTTO et al., 2011), enterocolites necrosantes em neonatos suínos (SHIBATA; ONO; MORI et al., 2001), além de poder diminuir os danos teciduais após indução de isquemia cerebral em ratos (CHOI et al., 2010) e recuperar a população linfocitária em animais imunologicamente deficientes desta mesma espécie (WAN et al., 2010)

Em humanos, a ingestão de colostro bovino vem sendo objeto de investigação, por poder oferecer aos atletas fatores de crescimento, imunoglobulinas, citocinas, lactoferrina, lisozimas, hormônio do crescimento, hormônios liberadores de

gonadotrofina, hormônio luteinizante (LH) e glicocorticóide, além de aumentar a capacidade imunológica, gastrointestinal e neuroendócrina, ampliando o rendimento físico dos atletas (SHING et al., 2009).

Em virtude de uma maior quantidade de colostro produzido pela espécie bovina, associada à facilidade de obtenção e propriedades similares ao colostro humano, várias indicações terapêuticas em humanos tem sido relatadas para esta primeira secreção mamária, como em distúrbios gastrointestinais, respiratórios, artrite reumatóide e outras lesões orgânicas (THAPA, 2005).

Dentre os componentes imunológicos presentes no colostro bovino, as imunoglobulinas foram as mais estudadas. Além delas, outros componentes celulares e humorais estão presentes no colostro e são de importância relevante no estabelecimento da imunidade do neonato.

O colostro bovino contém mais de 1×10^6 leucócitos/mL, de tipos celulares que variam de acordo com o tempo de parição, condições fisiológicas e individuais (BARRINGTON; PARISH, 2001). Dados da literatura relatam ainda a presença de citocinas e fatores de crescimento nesta secreção mamária, no entanto, pouco se sabe sobre as atividades desenvolvidas por essas substâncias, além das suas taxas poderem variar consideravelmente conforme a sanidade dos animais, práticas de manejo adotadas na propriedade, período entre a colheita e o processamento das amostras (KELLY, 2003).

As citocinas são proteínas secretadas tanto por células que participam da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa. São produzidas em presença de micro-organismos e outros antígenos, estimulando células durante a resposta imune e inflamatória (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Elas atuam e produzem uma cascata de efeitos combinatórios que contribuem para a organização, desenvolvimento e funcionamento do sistema imune.

Existem dificuldades na quantificação e estudos da ação das citocinas na glândula mamária, não se sabe ao certo se estas proteínas são secretadas pela própria glândula, pelos leucócitos presentes no colostro ou por ambos, além da secreção destas ocorrer em um tempo relativamente curto, no início da ativação celular, sendo totalmente consumida durante sua ação, e por atuarem na maioria das

vezes localmente, devido à sua curta meia-vida (ABBAS; LICHTMAN, 2005; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Além disso, o papel das citocinas na inflamação ainda não está completamente elucidado, em virtude de existirem variações entre os diferentes patógenos e suas toxinas (PAAPE et al., 2002). Nos neonatos bovinos, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α provenientes do colostro parecem estar associadas ao recrutamento de linfócitos no intestino e auxiliar no desenvolvimento da imunidade neonatal (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

A concentração das citocinas do sangue e colostro bovino foi determinada por diversos autores, envolvendo amostras de animais portadores de infecção ou após a estimulação das células com patógenos como a *Escherichia coli* (SORDILLO et al., 1991; SORDILLO; PELL 1992; RAINARD; PAAPE, 1997; SHUSTER et al., 1997; BANNERMAN et al., 2003; OHTSUKA et al., 2006; RABOT et al., 2007; BANNERMAN et al., 2008; MITTERHUEMER et al., 2010; RINALDI et al., 2010; BALLOU et al., 2011). Entretanto, poucos relatos internacionais e nenhum nacional existem determinando a presença das citocinas no colostro e sangue de animais hígidos (SORDILLO et al., 1991; GOTO et al., 1997; OKADA et al., 1997; HAGIWARA et al., 2000; HAGIWARA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2003b) e que futuramente poderiam auxiliar na avaliação da qualidade imunológica da glândula mamária e na seleção de animais mais resistentes à infecção, assim como na interferência que esta qualidade imunológica teria sobre a transferência de imunidade passiva ao neonato bovino.

Diante das diferenças encontradas na literatura, acerca da concentração das citocinas presentes no colostro e sangue bovino, assim como poucos relatos associados aos efeitos da *Escherichia coli* sobre estas concentrações, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) determinar as concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e colostro de fêmeas bovinas híginas da raça Holandesa;

- b) verificar a liberação de citocinas pelas células mononucleares do colostro e sangue bovino “in vitro”, antes e após a estimulação com *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET);
- c) avaliar a transferência das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α presentes no colostro aos bezerros neonatos, por meio da determinação das concentrações destas citocinas no soro sanguíneo dos seus conceptos, durante os quinze primeiros dias de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A eficácia da resposta imune da glândula mamária é determinada pela sua capacidade de promover a imunidade passiva do neonato, assim como garantir sua própria defesa frente aos inúmeros patógenos causadores de infecção (OPDEBEECK, 1982), porém acredita-se que essa resposta em primeira instância está direcionada ao bezerro neonato pela produção de colostro (GOMES, 2008).

Durante a gestação de espécimes bovinos, não há passagem de anticorpos da mãe ao feto, e assim sendo, o bezerro neonato nasce agamaglobulinêmico. Além disso, o recém-nascido possui sistema imune imaturo e deficiências na imunidade inata e específica decorrente do estresse no momento do parto. Assim, sua defesa orgânica é dependente da transferência da imunidade passiva pelo colostro (CHASE; HURLEY; REBER; 2008).

O colostro bovino contém fatores imunológicos, tais como imunoglobulinas, células e citocinas (GOMES, 2008), absorvidos pela mucosa intestinal dos neonatos até 36 horas de vida. A absorção dos componentes celulares intactos do colostro pela mucosa intestinal dos neonatos já foi comprovada e acredita-se que essas células estejam envolvidas com a resposta imune desses animais e são capazes de produzir citocinas, além das absorvidas pela própria ingestão de colostro (RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1991).

Assim, a hipótese desta pesquisa é de que as citocinas pró-inflamatórias presentes na primeira secreção láctea sejam importantes fatores imunológicos envolvidos com a amplificação da resposta imune inata de bezerros neonatos. Além disso, acredita-se que as células do colostro bovino possam ser estimuladas por antígenos para produção dessas substâncias. Portanto, a revisão de literatura apresentada a seguir abordará as deficiências do sistema imune inato do bezerro recém-nascido, componentes celulares e citocinas pró-inflamatórias presentes nessa secreção.

2.1 SISTEMA IMUNE DO BEZERRO NEONATO

O desenvolvimento dos mecanismos de defesa imunológica fetal ocorre ainda no ambiente intra-uterino. As células envolvidas com os mecanismos de imunidade inata e específica são originadas de uma mesma célula tronco hematopoiética e pluripotente. O timo é formado aproximadamente 40 dias após a concepção, a medula óssea e o baço aparecem aos 55 dias, os linfonodos com 60 dias e as placas de “Peyer” com 175 dias de gestação (TIZARD, 2008).

As células fagocitárias, tais como neutrófilos e macrófagos, garantem mínima proteção no início da vida fetal, pois permanecem por muito tempo no compartimento de proliferação e diferenciação, sendo liberados para a circulação sanguínea somente após 130 dias de gestação. Além disso, a capacidade fagocitária destas células se estabelece somente ao final da gestação, com pouca atividade bactericida, sendo rapidamente inibida próximo ao parto, em decorrência do aumento dos níveis séricos fetais de cortisol (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Os linfócitos envolvidos com a imunidade adquirida são originados das células tronco indiferenciadas, liberados inicialmente para a circulação e depois para os locais específicos de diferenciação, como o timo, responsável pela maturação dos linfócitos do tipo T. Os linfócitos B sofrem maturação na medula e placas de “Peyer”. Durante o primeiro terço do período de gestação, os linfócitos T e B migram dos órgãos linfóides primários para os linfonodos, baço e tecidos da mucosa linfóide, independente da exposição antigênica ou estimulação (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Os linfócitos são detectados no sangue de fetos bovinos com 45 dias de vida, a IgM com 59 dias e a IgG com 135 dias. A resposta neonatal ao rotavírus parece ocorrer por volta de 73 dias, ao parvovírus com 93 dias e ao vírus da parainfluenza 3, com 120 dias (TIZARD, 2008).

A quantidade de linfócitos T circulantes diminui consideravelmente um mês antes do nascimento do bezerro, pois estas células migram e colonizam os órgãos linfóides neste período. Os linfócitos B estão presentes em quantidades muito

menores nos fetos em desenvolvimento do que nos bezerros, com valores variando de 1 a 2% para 10 a 20%, respectivamente (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Após o nascimento, os neonatos bovinos deixam o ambiente intra-uterino estéril e ganham o meio externo, onde são expostos a variadas condições ambientais, com contaminação ou não, necessitando para sobreviverem, de uma resposta imune adequada para fazer frente a estas situações (TIZARD, 2008).

No entanto, esses recém-nascidos, apesar de apresentarem um sistema imune desenvolvido, não são capazes de desenvolver uma resposta imune satisfatória, em virtude da imaturidade funcional dos mecanismos de proteção e do tempo necessário para a geração de imunidade humoral e celular (BARRINGTON; PARISH, 2001, CORTESE, 2009). Adicionalmente, a placenta bovina do tipo sindesmocorial não permite a passagem de anticorpos maternos ao feto em desenvolvimento durante a gestação. A defesa orgânica, portanto, depende da transferência de imunidade passiva via colostro materno (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Ao nascimento, os órgãos linfóides primários e secundários são colonizados por células que se desenvolvem rapidamente e o número de linfócitos B corresponde a aproximadamente 30% do total encontrado nos animais adultos. Geralmente, as imunoglobulinas produzidas por estas células aparecem no sangue poucos dias após o nascimento (SENOGLES et al., 1978).

O sistema complemento dos neonatos tem eficácia que varia de 12 a 60% daquela dos adultos no momento do nascimento e não atinge os níveis dos adultos antes do bezerro completar seis meses de idade. As células T (CD4+, CD8+ e $\gamma\delta$ +) só são detectadas a partir dos oito meses de idade. Isto não significa que o animal seja incapaz de responder aos antígenos, porém esta resposta é mais fraca, mais lenta e mais fácil de ser vencida (CORTESE, 2009).

A imunidade mediada por células é também deficiente em bezerros recém-nascidos, e da mesma maneira que na imunidade humoral, a formação e maturação deste componente do sistema imune do bezerro se completarão em período mais

tardio, com os níveis de resposta se assemelhando aos dos adultos a partir da segunda semana de vida (SENOGLES et al., 1978).

A imunidade intestinal tem início na primeira semana de vida, com predomínio da produção de imunoglobulina do tipo M até as cinco semanas após o nascimento. Com o avançar do tempo, o predomínio passa a ser de imunoglobulina do tipo A, permanecendo este comportamento até a fase adulta (BARRINGTON, PARISH, 2001).

Considerando-se todos os mecanismos envolvidos com o desenvolvimento e resposta imune do neonato, verifica-se que, apesar de existentes, não são suficientes para garantir uma proteção eficaz contra todos os patógenos nos quais estes animais estão submetidos após o nascimento, e assim sendo, o neonato bovino passa a depender exclusivamente da ingestão do colostro.

A absorção das proteínas presentes no colostro pelas células do trato digestivo do neonato é facilitada pela baixa atividade da protease no suco gástrico destes animais, associada aos inibidores da tripsina presentes no colostro. As proteínas do colostro, portanto, não são degradadas para serem utilizadas como alimento, chegando intactas no intestino delgado. As imunoglobulinas se ligam aos receptores Fc presentes nas células epiteliais intestinais dos neonatos, denominados receptores FcRn e através da endocitose migram das células epiteliais para os capilares linfáticos e sanguíneos (TIZARD, 2008).

Com a evolução do tempo pós-nascimento (p.n.) haverá diminuição da capacidade de absorção das macromoléculas no trato intestinal, pois as células que contém o receptor FcRn começarão a ser substituídas por aquelas que não o expressam, sendo que em seis horas p.n. restarão apenas 50% das células iniciais absorptivas, 33% após 8 horas e 0% após 24 horas p.n. (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Além das imunoglobulinas, outro grupo de proteínas, como as citocinas, são absorvidas pela mucosa intestinal dos neonatos após a ingestão do colostro. As citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ passam a ser detectadas no sangue dos bezerros em doze horas após a ingestão do colostro, alcançando os valores

máximos em até 24 horas após o nascimento. Aos 28 dias de vida, estas citocinas não são mais detectadas no soro dos neonatos, sugerindo que o mecanismo de absorção das citocinas se assemelha ao das imunoglobulinas. Adicionalmente, verificou-se que as citocinas detectadas no soro dos bezerros foram provenientes da transferência via colostro, não sendo produzidas pelas células mononucleares do sangue, uma vez que a expressão do RNAm para estas citocinas no sangue é baixa (YAMANAKA et al., 2003a).

Com relação aos leucócitos presentes no colostro bovino, estes também ultrapassam a barreira intestinal e se distribuem pela circulação neonatal, promovendo melhorias nos mecanismos de defesa neonatal, através da transferência da imunidade mediada por células, melhora na transferência passiva das Igs, apresentam atividade bactericida e fagocítica no trato digestório e aumentam a atividade linfocitária, desaparecendo naturalmente da circulação neonatal entre três a cinco semanas de vida (CORTESE, 2009).

Gomes (2008) avaliou o colostro de primeira ordenha de vacas da raça Holandesa e encontrou valores medianos de 878.466 células/mL, sugerindo que, se o animal ingerisse o volume ideal de quatro litros de colostro nas primeiras doze horas de vida, receberia a quantidade aproximada de 35 milhões de células, o que certamente auxiliaria na imunidade intestinal e até mesmo sistêmica contra uma série de micro-organismos causadores de infecções.

O estresse no momento do parto ou nascimento é outro fator que influencia de forma considerável o sistema imune do neonato bovino, em virtude da liberação de corticosteróides e uma maior proporção de células T supressoras nestes animais, comprometendo a resposta imunológica na primeira semana de vida do bezerro (CORTESE, 2009).

A placenta bovina produz progesterona, prostaglandina E2 e citocinas, como IL-4 e IL-10, que suprimem a resposta imune mediada por células e Th1. Em contrapartida, estes mediadores promovem a resposta Th2 e produção de anticorpos. Com a proximidade do parto, as fêmeas bovinas produzem estrógeno e cortisol, ambos com efeitos imunossupressores, além do cortisol produzido pelo bezerro no momento do parto e que permanece elevado em sua circulação durante a

primeira semana de vida. O efeito acumulativo destes mediadores promove o desvio da resposta Th1 para a Th2, com produção de IgM (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

2.2 CÉLULAS DO COLOSTRO BOVINO

Um componente celular que participa da defesa orgânica está presente tanto na secreção quanto no tecido mamário, sendo que a quantidade e proporção dos tipos celulares variam conforme o período da lactação, a espécie animal envolvida, condições fisiológicas e individuais (BARRINGTON; PARISH, 2001). Na maioria das espécies, os leucócitos são as células predominantes, constituindo a primeira barreira imunológica contra patógenos (BOUTINAUD; JAMMES, 2002).

Os fagócitos são as principais células presentes no colostro bovino, especificamente os macrófagos. Em humanos, ocorre predomínio de células polimorfonucleares e células epiteliais (BOUTINAUD; JAMMES, 2002). No colostro bovino, por sua vez, estas células correspondem apenas a 15%, sendo a maioria predominante de células mononucleares (GOMES, 2008).

Em glândulas mamárias híginas de bovinos, poucos leucócitos são encontrados, porém, com o avançar da lactação, a concentração celular aumenta até um milhão de células/mL de colostro, e a proporção de neutrófilos pode chegar a 40%, quanto mais próximo se estiver do período seco (CONCHA, 1986).

Gomes et al. (2011) utilizaram a técnica de citocentrifugação e encontraram valores medianos de $0,657 \times 10^6$ leucócitos mononucleares, e de $0,178 \times 10^6$ leucócitos polimorfonucleares/mL no colostro bovino, antes da primeira ordenha de vacas da raça Holandesa. O total de leucócitos do colostro obtido por contagem, pela técnica de microscopia direta foi de $0,878 \times 10^6$. Destas células, 69,5; 16,4; 13,3 e 0,27% são monócitos/células epiteliais, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente.

Evans et al. (1982) avaliaram a morfologia das células presentes no colostro de fêmeas da espécie suína. O valor médio encontrado, para a contagem celular

total no colostro foi de 1×10^7 células/mL, sendo que estes valores foram decrescendo com o avançar da lactação, atingindo o número de 1×10^6 células/mL no décimo dia após o parto. As células polimorfonucleares foram as mais encontradas no colostro suíno, os linfócitos representaram entre 4,2 e 49% e os macrófagos não excederam 2,5%.

Os neutrófilos realizam as funções mais importantes envolvidas com o mecanismo de imunidade inata, tais como a aderência ao endotélio vascular e aos componentes da matriz extracelular, migração quimiotática, ingestão e produção de radicais livres derivados do oxigênio durante a destruição de microorganismos (CHUN et al., 1997).

As células polimorfonucleares isoladas do colostro possuem menores capacidades migratória e fagocitária, quando comparadas às daquelas presentes no sangue, acreditando-se ser o fato decorrência da maior importância como participantes na defesa da glândula mamária do que da proteção do neonato (BARRINGTON; PARISH, 2001; GOMES, 2008), ou pelo fato de, na glândula mamária, fagocitarem gordura, caseína e outros componentes presentes no leite (PAAPE et al., 2001).

Estudo realizado com macrófagos presentes no colostro bovino sugere que as principais funções destas células são a detecção dos patógenos, início da resposta inflamatória, produção de citocinas e apresentação de antígenos. Nos tecidos e secreções mamárias livres de infecção, o macrófago é a célula predominante, apesar de possuir menor capacidade fagocitária, quando comparado ao neutrófilo (POLITIS et al., 1991).

Os linfócitos representam até 30% do componente leucocitário total presente nas secreções mamárias da espécie bovina e 20 a 25% na espécie ovina (BARRINGTON; PARISH, 2001). No colostro das fêmeas bovinas, a quantidade é de aproximadamente 16% (GOMES, 2008). Os linfócitos presentes no colostro são responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos através dos receptores localizados em suas membranas (RAINARD; RIOLLET, 2006), além de oferecerem imunidade ao neonato e produzirem citocinas (LE JAN, 1996).

Duas subpopulações de linfócitos B e T são conhecidas e diferem entre si na função e produção protéica. Os linfócitos T são subdivididos em população de linfócitos $T\alpha\beta$, que incluem o linfócito $TC\alpha 4^+$ (T helper) e o linfócito $TC\alpha 8^+$ (T citotóxico ou T supressor) e população de linfócitos $T\gamma\delta$. As porcentagens das populações linfocitárias variam conforme o estágio da lactação e localização tecidual (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

Park et al. (1992) usando a técnica de citometria de fluxo determinou as subpopulações dos leucócitos mononucleares presentes na secreção mamária durante a lactação. Observou variação de 15 a 31% de células mononucleares ao longo da lactação, sendo que os menores valores foram observados no período seco. A porcentagem de linfócitos T da secreção mamária variou de 16% no período peri-parto à 62% ao final da lactação. O número de linfócitos B variou de 7 a 25% durante o período peri-parto. As proporções de macrófagos variaram de 21 a 69%, nesse mesmo período. Estes autores relataram que no período peri-parto observava-se maiores valores da relação de linfócitos $CD4:CD8$ no sangue (1,18) quando comparada com aquela da secreção mamária (0,80) durante o ciclo de lactação. No pós-parto imediato observaram relação $CD4:CD8$ na secreção mamária de 0,95. Na secreção mamária do período periparto observaram predomínio de linfócitos $CD4^+$ (31,5%) em relação ao $CD8^+$ (21%).

Os linfócitos do tipo B representam 24% das células presentes no colostro bovino, cuja função principal é sintetizar o dímero da imunoglobulina A, que posteriormente será excretada nas secreções mamárias (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Além das células presentes no colostro ou leite, algumas são residentes do tecido mamário, tais como os linfócitos do tipo T, principalmente os $CD4^+$ no tecido interalveolar, $CD8^+$ ao redor dos alvéolos, alguns macrófagos, linfócitos do tipo B e células dendríticas (RAINARD; RIOLLET, 2006). Os linfócitos são encontrados no interior do epitélio da cisterna do teto, enquanto que os monócitos/macrófagos são encontrados em pequena quantidade. Os leucócitos são mais freqüentemente

encontrados na porção final da cisterna do teto (NICKERSON; PANKEY, 1983; NICKERSON; BODDIE, 1984)

2.3 CITOCINAS

O termo citocina designa um grupo de proteínas produzidas por diferentes tipos celulares, sob circunstâncias diversas que podem participar tanto do mecanismo de resposta imune inata quanto adaptativa. Atualmente, mais de 30 tipos foram identificados, purificados e caracterizados de acordo com suas atividades. As citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade inata são: Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-1 (IL-1), Quimiocinas, Interleucina-12 (IL-12), Interferons tipo 1 (INFs), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-15 (IL-15), Interleucina-18 (IL-18) (TIZARD, 2008).

A secreção das citocinas está relacionada à existência de duas subpopulações de células *T helper*. As células Th1 estão relacionadas às funções envolvidas com a imunidade mediada por células e secretam principalmente IL-2, IL-3, TNF- α e IFN- γ . As células Th2 estão relacionadas com a produção de anticorpos e produzem principalmente IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e ínfimas concentrações de IFN- γ (MAYER; MAYER-GUIGNARD, 1998).

Diferentes tipos de citocinas pró-inflamatórias podem estar presentes no colostro e no leite bovino, com destaque para IL-1 β , IL-6 e TNF- α e IFN- γ (GOTO et al., 1997; HISAEDA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2001; PAAPE et al., 2002; YAMANAKA et al., 2003a; YAMANAKA et al., 2003b HAGIWARA et al., 2008; RANGEN et al., 2009). No entanto o papel dessas citocinas na secreção mamária ainda é desconhecido, assim como a importância dessas proteínas ao bezerro neonato após imunização passiva. O detalhamento dos conhecimentos das origens e funções biológicas destas citocinas será discutido nos tópicos a seguir.

2.3.1 Interleucina 1- β (IL-1 β)

A IL-1 é uma das citocinas pró-inflamatórias que pode ser produzida por vários tipos de células, incluindo os monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, em resposta a injúrias, infecções bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias e fatores não infecciosos, como o TNF- α , IL-12 e o fragmento C5a do sistema complemento. A interleucina-1 induz a produção de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12, podendo atuar em sinergia, aumentando os efeitos do TNF- α e IL-6 (COLOTTA; GHEZZI; MANTOVANI, 1998).

A IL-1, quando secretada em baixas taxas, atua como mediadora da inflamação local e em maiores teores, como mediador endócrino na corrente sanguínea, compartilhando os mesmos efeitos sistêmicos da citocina TNF (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Esta citocina possui efeitos nas células hematopoiéticas, estimulando a produção de novas células sanguíneas, acelera a recuperação medular após quimioterapias ou radiações, estimula a produção de linfócitos T, prolonga a sobrevivência das células polimorfonucleares pelo bloqueio da apoptose, ativa as células endoteliais e induz a produção do fator ativador de plaquetas; no sistema neuroendócrino, estimula a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, levando à uma produção de adrenocorticotrofina pela glândula pituitária e liberação de corticosteróides na circulação pela adrenal, promovendo um efeito semelhante ao provocado no estresse; atua no sistema nervoso central, resultando em hipertermia e anorexia. Além disso, a IL-1 é um potente mediador da resposta inflamatória, induzindo a formação das proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa, fibrinogênio e amilóides séricos (COLOTTA; GHEZZI; MANTOVANI, 1998).

Em virtude dos vários mecanismos existentes para o controle da produção e ação da IL-1, a complexidade desta citocina pode ser melhor representada utilizando-se o termo “sistema IL-1”, que compreende os agonistas IL-1 α e IL-1 β , um sistema específico de ativação, um receptor antagonista (IL-1Ra) e duas moléculas

de adesão de superfície de alta afinidade. Os genes da citocina IL-1 não são expressos em células que não foram estimuladas, entre elas incluem-se os monócitos sanguíneos, células vasculares e fibroblastos. As células da linhagem monócito-macrófago são as que mais expressam a citocina IL-1. Em contrapartida, vários estímulos externos podem ativar os genes da IL-1, citando-se entre eles: endotoxinas das bactérias Gram-negativas, exotoxinas das bactérias Gram-positivas, o Phorbol 12-miristoato 13-acetato (PMA), luz ultravioleta, linfócitos T, componentes do sistema complemento e o lipopolissacarídeo (LPS) presente nas bactérias Gram-negativas (COLOTTA; GHEZZI; MANTOVANI, 1998).

Alguns agentes endógenos, como prostaglandinas e glicocorticóides inibem a síntese de IL-1. Células estimuladas com LPS ou PMA produzem tanto IL-1 quanto PGE₂, sugerindo que pode haver nesta situação um mecanismo de *feedback* negativo (COLOTTA; GHEZZI; MANTOVANI, 1998).

2.3.2 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 possui propriedades pró e antiinflamatórias e atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, podendo ser expressa por linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células, em resposta ao estímulo de bactérias, vírus ou a outras citocinas (IL-1 β e TNF- α). Os glicocorticóides e a IL-4 inibem a produção desta citocina (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A interleucina-6 não é armazenada nas células, porém, com o estímulo celular e aumento dos níveis de RNAm, ocorre rapidamente a síntese da proteína e a expressão da citocina. Os monócitos e macrófagos podem ser os primeiros a liberar IL-6 durante a inflamação, pois produzem IL-1 e TNF, que são potentes indutores da liberação da IL-6 por células como fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (RICHARDS, 1998).

Dentre os vários efeitos biológicos da IL-6 podem incluir-se aqueles relacionados ao local da inflamação e na interação e ativação de linfócitos; além de induzir respostas em linfócitos B, *T helper*, T citotóxicos e “Natural Killer” (NK), atuar na hematopoiese e regular o crescimento celular (RICHARDS, 1998).

A IL-6 estimula a síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, a produção de neutrófilos, o crescimento de linfócitos do tipo B, atua como um fator de crescimento para plasmócitos neoplásicos (ABBAS; LICHTMAN, 2005) e prejudica a cicatrização após anastomoses colônicas em ratos (GRECA et al., 2007).

Dentre as propriedades antiinflamatórias da IL-6, pode-se citar a habilidade em inibir a expressão da IL-1 β e TNF- α e em estimular a expressão do receptor antagonista de IL-1 e do TNF (BANNERMAN, 2009).

As concentrações de IL-6 apresentam-se elevadas no leite, variando de 10 a 50 ng/mL e no sangue (30 a 90 ng/mL) de vacas com mastite naturalmente adquirida (HAGIWARA et al., 2001). Nos casos de mastite induzida a concentração da citocina no leite aumentou durante 16 horas de infecção (SHUSTER et al., 1997).

Em éguas, os valores médios das concentrações da citocina IL-6, no soro e colostro, foram de, respectivamente 3.242 e 11.429 ng/mL (BURTON et al., 2009), indicando que o colostro é muito mais rico dessa citocina e que o fato pode surgir como reflexo de sua ação local.

2.3.3 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

A TNF é uma proteína altamente pró-inflamatória e que apresenta propriedades benéficas e injuriantes, podendo ser encontrada no leite durante toda a lactação, mas diminui de quatro a seis semanas antes do parto (SORDILLO et al., 1991). É o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias Gram-negativas e outros patógenos, estimulando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da infecção, tornando-os ativos para a eliminação dos microorganismos (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

Muitas células são capazes de produzir TNF- α , incluindo-se entre elas os macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células epiteliais, sendo estimulada a produção desta citocina por vírus, fungos, bactérias, parasitos, os produtos da parede bacteriana e suas toxinas, citocinas como IL-1, IFN- γ , IL-6 e componentes do complemento (BANNERMAN, 2009).

Dentre as várias atividades biológicas do TNF- α , pode-se citar, *in vitro*: a citotoxicidade; diferenciação de adipócitos e monócitos; estimula a mitose de fibroblastos, células musculares lisas e células do tipo B e T; atividade imunomodulatória e antiinflamatória, além de induzir a síntese de genes envolvidos com a inflamação, reparo tecidual, hematopoiese, resposta imune e efeitos antitumorais. Quando *in vivo*, o TNF exerce atividade antitumoral e induz a síntese de mediadores como prostaglandinas e glicocorticóides (BEYAERT; FIERIS, 1998).

Nos processos infecciosos graves, o TNF- α passa a ser sintetizado em grande quantidade, deixando de ter ação parácrina para ter ação endócrina, causando febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, perda de células musculares e adiposas do organismo, inibindo a contratilidade do miocárdio e da musculatura lisa dos vasos, promovendo trombose intravascular e diminuição nas concentrações de glicose sanguínea (ABBAS; LICHTMAN, 2005), podendo levar o indivíduo à morte.

Fêmeas bovinas adultas tratadas com TNF- α recombinante bovina apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos e imunológicos quando menos de 0,5 mg de TNF/100Kg de peso foi administrado por via intramuscular, duas vezes ao dia, durante 18 dias. O tratamento prolongado com doses de 0,05 a 0,5 mg/100Kg promoveu alterações histológicas leves nos rins e fígado dos animais avaliados. A dosagem de 0,5 mg/100Kg levou ao aparecimento de sintomas como depressão, anorexia, caquexia e diarreia, além de lesões no fígado, rins, órgãos linfóides e depleção dos depósitos de gordura (OHMANN et al., 1989).

A quantidade de macrófagos no tecido mamário aumenta gradualmente até atingir números máximos no momento do parto, podendo-se encontrar altos teores

desta citocina no colostro bovino, uma vez que o TNF- α é produzido através da estimulação destes fagócitos (SORDILLO et al., 1991).

2.3.4 Interferon- γ (IFN- γ)

O IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções tanto na imunidade inata quanto na adaptativa mediada por células, podendo ter também alguma atividade antiviral menos potente, sendo produzido pelos linfócitos T e NK. As células T são estimuladas a produzir IFN- γ de forma policlonal, via mitógenos ou anticorpos, ou através da maneira antígeno-específica (MAYER; MAYER-GUIGNARD, 1988).

O IFN- γ acentua a função microbicida dos macrófagos, ativando a transcrição de genes que codificam as enzimas fagócito-oxidase e sintase, indutora da produção do óxido nítrico, que atuando dentro dos lisossomos destroem os micro-organismos presentes. Nos macrófagos, a citocina estimula ainda a produção de peróxido de hidrogênio e ativa a capacidade anti-tumoral destas células. Adicionalmente, o IFN- γ promove a diferenciação de células T CD4⁺ em subpopulação Th1, inibindo a proliferação de células Th2, através da ativação de fagócitos mononucleares produtores de IL-12, citocina indutora de Th1; ativa neutrófilos e estimula a atividade citolítica das células NK (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A mensuração do IFN- γ vem sendo estudada no Canadá, como potencial auxiliar no diagnóstico da tuberculose bovina, em associação com as provas da tuberculina aplicada por via caudal ou cervical, com o intuito de poder futuramente substituir a prova cervical, por aumentar a sensibilidade dos resultados, diminuir a manipulação dos animais, evitar a realização de repetição dos testes e permitir diferenciação entre a exposição do animal ao *Mycobacterium avium*, respostas vacinais prévias ou animais infectados pelo *Mycobacterium bovis* (RANGEN et al., 2009). No entanto, em virtude da alta sensibilidade do teste, esses autores

verificaram um número maior de animais falso positivos, em comparação aos testes já padronizados para o diagnóstico da tuberculose bovina, uma vez que o INF- γ pode sofrer influência de vários fatores, entre eles a diferença da resposta imune entre os animais, a reação cruzada com outras espécies de *Mycobacteria* ou a outros micro-micro-organismos associados, tempo entre a colheita e o processamento das amostras e testes com tuberculina recentemente realizados.

Em humanos, a capacidade antiviral dos leucócitos do colostro é determinada através da eficácia na produção de Interferon. Lawton et al. (1979) verificaram que as células do colostro humano produzem altos níveis de interferon no período pré-parto, quando comparadas àquelas do período pós-parto, além de que os leucócitos colostrais são menos eficientes na produção desta citocina do que os leucócitos sanguíneos.

Hagiwara et al. (2008) utilizaram a citometria de fluxo para identificar e quantificar as populações de linfócitos presentes no colostro bovino (CD4; CD8 e $\gamma\delta$ -T) e conseqüentemente a produção de IFN- γ por essas células. O valor médio da taxa da citocina presente no sobrenadante do colostro de 96 vacas da raça Holandesa, no momento do parto, foi de $62,2 \pm 9,4$ ng/mL. Os valores decresceram com o avançar da lactação, tornando-se indetectáveis a partir do sétimo dia após o parto. Com relação aos tipos linfocitários, CD8 e $\gamma\delta$ -T foram encontrados em quantidade significativamente maior que o CD4, sendo que os três tipos de linfócitos também decresceram após o parto. Os linfócitos CD8 expressaram quatro vezes mais o gene do IFN- γ do que o linfócito CD4, sugerindo que estas células possuem um papel importante na produção da citocina no colostro.

2.4 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS DO COLOSTRO NA IMUNIDADE NEONATAL

Um fato que já está bem consolidado na literatura diz respeito à necessidade de ingestão do colostro pelos neonatos da espécie bovina, pois de acordo com a característica placentária da referida espécie, não há transferência dos componentes imunológicos da mãe para o feto durante a gestação.

O colostro é responsável por transferir ao neonato proteínas imunológicas e nutrientes, que auxiliam na sua sobrevivência durante os primeiros dias de vida. Diversos fatores podem interferir na absorção desses componentes pelo neonato, destacando-se: a idade no momento da primeira ingestão do colostro; a raça; o método de oferecimento do colostro; a condição metabólica do bezerro; baixas temperaturas ambientais; altas taxas sanguíneas de glicocorticóides endógenos; concentração de imunoglobulinas presentes no colostro e quantidade de colostro ingerido (QUIGLEY; DREWRY, 1998).

Dentre os componentes imunológicos do colostro bovino responsáveis por auxiliar no desenvolvimento da imunidade dos neonatos, as citocinas têm sido objeto de investigação, no que diz respeito à quantidade e funcionalidade no soro desses animais (GOTO et al., 1997; YAMANAKA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2003b; OHTSUKA et al., 2006; HAGIWARA et al., 2001).

Goto et al. (1997) avaliaram a presença da citocina IL-1 β no soro, colostro e leite de fêmeas bovinas adultas e sadias e a origem da atividade da IL-1 β no soro de neonatos bovinos. As amostras de sangue foram colhidas de vacas gestantes ou em lactação, de bezerros entre o nascimento e 180 dias de vida e novilhas com aproximadamente um ano de idade. O colostro/leite foi colhido de vacas sadias no período de 20 dias antes a 14 dias após o parto. A citocina foi determinada através do método de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*), sendo encontrada no soro de 90% das vacas durante o período de dois dias antes até 14 dias após o parto, com os valores diminuindo gradativamente e se tornando imperceptíveis em 90% dos animais, sete a nove

semanas após o parto. No dia do parto, o valor médio encontrado no soro foi de 2 ng/mL. A IL-1 β foi encontrada no soro de 10 dos 14 bezerros avaliados durante as duas primeiras semanas de vida e somente em uma novilha com aproximadamente um ano. A presença da citocina na secreção mamária foi avaliada nos dias zero (do parto), três, sete e 14 dias após o parto, sendo somente detectada no dia zero, com valores médios de aproximadamente 3,8 ng/mL. A partir destes resultados, os autores puderam verificar que a Interleucina-1 β está presente em maiores concentrações no soro momentos antes do parto e que a mesma pode ser transferida aos bezerros através da ingestão do colostro materno, já que no momento do parto foi detectada em maiores concentrações no colostro, quando comparada ao leite.

Hagiwara et al. (2001) avaliaram os efeitos imunológicos nos bovinos neonatos após a administração oral de 100 ng de IL-1 β bovina purificada em três bezerros que não ingeriram colostro, com mensuração desta citocina no soro dos animais. Os resultados mostraram que existe a transferência e absorção desta citocina após a ingestão de colostro, além de se observar um aumento considerável dos leucócitos presentes na circulação sanguínea dos neonatos, ressaltando a importância da transferência de imunidade passiva na sanidade do bovino neonato.

O efeito do receptor antagonista de IL-1 β (IL-1ra) na resposta mitogênica das células mononucleares sanguíneas, para produção da citocina IL-1 β , em bezerros neonatos foi avaliado por Yamanaka et al. (2001), uma vez que a presença simultânea de IL-1 e IL-1ra no colostro bovino e conseqüentemente a transferência destes ao soro dos conceptos parece ser paradoxal, já que o receptor bloqueia a atividade da IL-1 β . Para esta avaliação foram obtidas amostras de sangue provenientes de seis bezerros, antes da ingestão do colostro. As células mononucleares destes neonatos foram separadas por gradiente de concentração e incubadas em placa de cultivo celular, na concentração de 1×10^5 , juntamente com IL-1 β bovina recombinante (rb), rbIL-1ra, anti-rbIL-1 α e anti-rbIL-1 β . Após duas horas de incubação das placas a 37°C, adicionou-se 25 μ L de concanavalina A (ConA), responsável por promover a proliferação de linfócitos T na presença de um co-

estimulador, no caso deste trabalho, a IL-1. Os autores verificaram que o tratamento com rIL-1ra suprimiu a proliferação das células estimuladas com ConA e a presença de rIL-1 β neutralizou a atividade supressora do rIL-1ra, sugerindo que a existência simultânea de IL-1ra e IL-1 no colostro bovino pode bloquear a ativação do sistema imune neonatal para síntese de IL-1 β .

Animais deficientes de IFN- γ ou de seu receptor são susceptíveis a infecções por micro-organismos intracelulares, devido à ativação inadequada dos macrófagos. Alguns autores citam que neonatos de muitas espécies apresentam deficiência na resposta de Th1, entre eles, os da espécie eqüina, que podem apresentar inabilidade de linfócitos em produzir Interferon gama, principalmente daqueles localizados nos sistemas circulatório e pulmonar, tornando-os susceptíveis a uma série de patógenos, entre eles, o *Rhodococcus equi* (BREATHNACH et al., 2006; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Yamanaka et al. (2003) mostraram a presença de altas concentrações de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no colostro bovino e comprovaram que estas citocinas são transferidas aos neonatos durante a amamentação e contribuem para o desenvolvimento das funções imunológicas dos bezerros. Estas citocinas foram detectadas no soro dos neonatos 12 horas após a ingestão do colostro e desapareceram da circulação quatro semanas após o nascimento.

Ustundag et al. (2005) avaliaram os teores de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α) no leite de 40 mulheres lactantes, das quais 20 tiveram seus bebês no período normal de gestação e 20 os tiveram prematuros, obtendo-se as amostras em quatro diferentes períodos ou momentos pós-parto (p.p.) (0-7 dias p.p., ou seja, secreção colostrar; 7-14 dias p.p, 21 dias p.p. e no segundo mês de lactação). Os valores das diferentes classes de citocinas foram maiores no colostro e leite das mães cujos bebês eram maduros. As maiores taxas eram do colostro e foram diminuindo com o avançar da lactação. Os autores puderam concluir que as diferenças nos valores de citocinas em diferentes períodos da lactação podem refletir mudanças no sistema imune da glândula mamária e conseqüentemente, na necessidade da ingestão destas citocinas pelos bebês.

Os efeitos da administração oral de IFN- α na resposta imune de bezerros sadios foi avaliada por Ohtsuka et al. (2006), através do estudo dos leucócitos sanguíneos e a habilidade destes em produzir RNAm. Os animais receberam, por via oral, 0,1 g/dia de IFN- α , durante os cinco primeiros dias de vida. A população de monócitos aumentou gradualmente após o nascimento nesses animais e atingiu número máximo após 4 semanas do nascimento, a concentração da citocina IL-12 também foi mais elevada nos animais tratados, sugerindo que a administração de IFN induziu a ativação dos monócitos.

2.5 PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS FAGÓCITOS DO COLOSTRO

Se os micro-organismos Gram-negativos, como a *Escherichia coli*, conseguem penetrar a primeira linha de defesa do corpo, tais como barreiras mecânicas, químicas e biológicas, o sistema imune inato fornece a segunda linha de defesa contra a infecção (DOAN et al., 2008).

O reconhecimento do antígeno pelo sistema imune inato ocorre pela junção de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células fagocitárias da corrente sanguínea, com padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Dentre os PRRs está o “toll like receptor” (TLR) do tipo 4 envolvido no reconhecimento de lipopolissacarídes (LPS) presentes nas bactérias Gram negativas, como a *Escherichia coli* (ABBAS; LICHTMAN, 2005; DOAN et al., 2008; TIZARD, 2008).

A ligação do TLR-4 aos PAMPs promove a aderência de uma célula ou uma molécula a um fagócito. Em seguida, o micro-organismo ou partícula estranha é engolfado pela emissão de pseudópodes e levado para dentro da célula por endocitose, ocorrendo a formação do fagossoma e fagolisossoma. A destruição do micro-organismo ocorre por mecanismos enzimáticos e dependentes de oxigênio - explosão respiratória. A aderência e digestão do micro-organismo desencadeiam mudanças dentro do fagócito, como o aumento de tamanho, tornando-o mais

agressivo na destruição de outros patógenos e elevando a produção de citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; DOAN et al., 2008; TIZARD, 2008;).

Após a ativação, os fagócitos secretam citocinas e quimiocinas atraindo e ativando outras células da resposta imune inata. A IL-1 e IL-6 induzem a produção de proteínas que elevam a temperatura corporal, o TNF-alfa aumenta a permeabilidade do epitélio vascular local e o movimento de células e moléculas solúveis dos vasos para os tecidos. Outras, como a IL-8 e IL12 atraem e ativam leucócitos como neutrófilos e células NK (ABBAS; LICHTMAN, 2005; DOAN et al., 2008; TIZARD, 2008;) (Figura 1).

Em bovinos com mastite causada por bactérias Gram-negativas pôde-se observar que o LPS promoveu aumento nas concentrações das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- γ no leite (RAINARD; PAAPE, 1997; SHUSTER et al., 1997; BANNERMAN et al., 2003; BANNERMAN et al., 2008; MITTERHUEMER et al., 2010), citocinas estas responsáveis pelo quadro clínico manifestado pelas vacas doentes, tais como hipertermia, aumento do número de células somáticas, anorexia e diminuição da produção de leite.

Os sinais inflamatórios decorrentes da infecção mamária por *E. coli* podem aparecer somente doze horas após a inoculação do agente, juntamente com o aparecimento da atividade quimiotática dos neutrófilos no leite das glândulas infectadas. Esta demora na resposta inflamatória pode ser devido ao atraso no recrutamento dos neutrófilos, em virtude da falta de um reconhecimento inicial bacteriano e da produção de mediadores inflamatórios (SHUSTER et al., 1997).

A *E. coli* promove ainda uma ativação de genes relacionados com a resposta imune e inflamatória e codificadores de proteínas, que atuam na quimiotaxia, ativação leucocitária, aumento da secreção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, degradação protéica e apoptose (MITTERHUEMER et al, 2010; RINALDI et al., 2010).

Rainard e Paape (1997) verificaram a resposta de fase aguda promovida na glândula mamária de vacas através de infusões repetidas da endotoxina da *E. coli*, e avaliada através das concentrações de TNF- α no leite. Após a primeira infusão, as

concentrações da citocina no leite passaram de indetectáveis para uma concentração máxima de 0,4 ng/mL, após 4 horas da infusão, e declinaram para concentrações de 0,04 ng/mL após 24 horas. Em animais que receberam duas infusões, o aumento da citocina foi abrupto, chegando a 11,7 ng/mL após 6 horas da segunda infusão (24 horas após a primeira infusão). A TNF- α não foi detectável no leite dos animais do grupo controle ($< 0,04$ ng/mL).

Evans et al. (1982) avaliaram a capacidade fagocitária à levedura das células presentes no colostro e leite de fêmeas da espécie suína, comparando-as aos macrófagos alveolares e monócitos sanguíneos. Dentre os fagócitos, somente os neutrófilos do leite fagocitaram a levedura, quando se utilizou o soro sanguíneo como opsonina, sendo que o índice fagocitário foi menor do que o obtido pelos macrófagos alveolares.

Figura 1 – Esquema simplificado do processo inflamatório e produção de citocinas, adaptado de Doan et al. (2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A linha de pesquisa referente ao estudo das citocinas do colostro e sangue de fêmeas bovinas e bezerros neonatos se iniciou no presente trabalho, necessitando, desta forma, da disponibilização de um tempo maior para a etapa de treinamento e padronização dos procedimentos laboratoriais e de colheita das amostras. Em virtude disto, houve a necessidade de obtenção de um número de amostras acima do previsto no projeto inicial, pois muitas tiveram que ser descartadas, por não possuir a quantidade de células viáveis necessárias à realização do experimento, contaminação da placa de cultivo celular e identificação da positividade de algumas amostras ao exame bacteriológico.

Considerando o aumento do número de amostras obtidas e o tempo utilizado para as várias etapas relacionadas ao processamento destas, não foi possível, em um primeiro momento, se avaliar as concentrações das citocinas no sangue dos bezerros neonatos, assim como avaliar o papel que elas possivelmente possuem na transferência de imunidade passiva.

Portanto, a metodologia do presente trabalho foi dividida em duas etapas, sendo que na primeira objetivou-se determinar a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e sobrenadante de colostro, além do sobrenadante de cultivo dos fagócitos presentes no sangue e colostro das fêmeas bovinas, antes e após a estimulação celular com a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET). Nesta etapa também foi realizada a avaliação morfológica dos fagócitos mononucleares do sangue e colostro, assim como o teste da fagocitose destas células para a ECET.

A segunda etapa foi realizada visando-se avaliar a transferência das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelo colostro ao sangue dos bezerros neonatos. Para tanto, amostras de colostro foram obtidas das fêmeas bovinas, além do sangue dos bezerros neonatos, antes da ingestão do colostro e com 24, 72, 96 horas e 15 dias após o nascimento.

Os kits utilizados para a mensuração da citocina IFN- γ , nas amostras obtidas ainda primeira etapa da pesquisa, foram adquiridos com muita dificuldade, em virtude da não existência destes, na época da aquisição, nos estoques da empresa no Brasil. Da quantidade calculada de kits necessários para as determinações de todas as amostras obtidas na pesquisa, somente metade desta quantidade foi adquirido, pois durante esta tramitação de importação e entrega do produto, o kit foi descontinuado pela empresa. Em virtude destes percalços, não houve tempo hábil para a importação e entrega dos kits adicionais, necessários á mensuração desta citocina nas amostras obtidas na segunda etapa, mas ressalta-se que os kits já foram encomendados e as amostras serão processadas para publicações futuras.

As duas etapas da pesquisa foram realizadas em duas propriedades leiteiras distintas, localizadas no interior do Estado de São Paulo.

3.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Na primeira etapa do trabalho, as amostras de colostro e sangue foram obtidas de vacas e novilhas da raça Holandesa, em uma fazenda produtora de leite do tipo A, localizada no interior do Estado de São Paulo, distante da capital em aproximadamente 170 km, e que foi escolhida por se tratar de uma propriedade com alto controle sanitário, além do grande número de partos diários e a realização de três ordenhas/dia, ampliando as possibilidades de colheitas e obtenção das amostras.

O projeto inicial previa a utilização de 15 fêmeas bovinas em fase puerperal, porém, houve a necessidade da colheita de amostras provenientes de 22 animais, uma vez que em algumas fêmeas foram observadas alterações durante o exame físico da glândula mamária, além da positividade de algumas amostras ao exame bacteriológico do colostro e que foram descartadas da pesquisa.

Para a realização da segunda etapa da pesquisa, amostras de colostro foram obtidas de 11 fêmeas bovinas, também da raça Holandesa, provenientes de uma propriedade localizada no interior do Estado de São Paulo, distante da capital em aproximadamente 140 Km. A propriedade foi escolhida por adotar, dentre as técnicas de manejo, o oferecimento de colostro fresco aos bezerros neonatos, provenientes de suas próprias mães, ordenhado imediatamente após o parto e oferecido através de mamadeira, em quantidade de 10% do peso vivo dos neonatos, em duas alimentações diárias.

Ainda na segunda etapa e com o objetivo de se avaliar a transferência das citocinas pelo colostro, amostras de sangue foram obtidas de 11 neonatos bovinos, machos e fêmeas, provenientes das 11 fêmeas bovinas cujas amostras de colostro foram colhidas. Todos os neonatos utilizados eram machos da raça Holandesa, nascidos de parto eutócico, criados sob regime intensivo e que foram acompanhados quanto ao estado de saúde do nascimento até os 15 dias de idade. Os animais foram separados de suas mães imediatamente após o nascimento e receberam os cuidados habituais recomendados no período pós-parto.

3.2 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram selecionados através do exame físico, segundo os procedimentos descritos por Dirksen (1993), excluindo-se os animais que apresentaram qualquer alteração orgânica. Foram registrados os dados referentes à idade das fêmeas bovinas, número de lactações e casos precedentes de mastites. Com relação ao parto, foram registradas a data, eventos e intervenções ocorridas.

Os bezerros foram avaliados diariamente através de exame físico, que incluiu a avaliação do estado geral, funções vitais (frequências respiratória e cardíaca, e temperatura corpórea), grau de hidratação, mucosas aparentes, características das fezes e acompanhamento do processo de cicatrização umbilical, além de qualquer outra alteração orgânica detectada no exame físico.

3.3 ALIMENTAÇÃO E MANEJO GERAL DOS ANIMAIS

Na propriedade utilizada na primeira etapa da pesquisa, todas as vacas parturientes eram mantidas em sistema “free-stall”, recebendo alimentação balanceada de acordo com o peso e produção láctea.

No período compreendido entre 245 a 250 dias de gestação, as fêmeas eram transferidas para o galpão destinado às vacas próximas ao parto ou em lactação (Figura 2). As fêmeas eram observadas diversas vezes ao dia quanto à presença de sinais indicativos de parto. No ato da detecção destes, as vacas eram transferidas para piquetes individuais, com bebedouros automáticos e cama composta por serragem de maravalha (Figura 3).

Após a ruptura dos envoltórios fetais e exposição dos cascos do feto, aguardava-se o período de duas horas, no caso de fêmeas múltiparas, e duas horas e meia, no caso das novilhas. Caso o parto não ocorresse neste período, o mesmo era auxiliado por até dois tratadores, através de tração manual, com o auxílio de correntes obstétricas ou com um aparelho de tração.

Todos os partos das fêmeas utilizadas na pesquisa foram acompanhados e verificou-se que em nenhum deles houve a mamada de colostro pelo bezerro antes da primeira ordenha da vaca. Além disso, já ocorria na propriedade, como método padrão de manejo, a separação do neonato de sua mãe imediatamente após o parto, garantindo, desta forma, um controle pleno das amostras de colostro obtidas.

A ordenha da fêmea bovina adulta era programada sempre se respeitando os horários determinados da Fazenda, pois todas as fêmeas em lactação eram agrupadas em lotes, respeitando-se a seqüência destes na sala de ordenha (Figura 4). Portanto, caso o lote de animais no qual a fêmea parida pertencia já tivesse sido ordenhado, esta permanecia no piquete maternidade até o momento da próxima ordenha, que eram realizadas diariamente às 05h00min, 13h00min e 20h00min. Portanto, de acordo com os horários dos partos das fêmeas utilizadas nesta pesquisa, a colheita das amostras foi realizada tanto na sala de ordenha quanto no piquete maternidade. Todas as fêmeas desta propriedade eram vacinadas

periodicamente, utilizando-se as vacinas Rotatec-J5® (diarréia neonatal e mastite ambiental), Kevac® (ceratoconjuntivite infecciosa bovina) e Sintoxan® (clostridioses).

Com relação á propriedade utilizada na segunda etapa da pesquisa, as fêmeas bovinas eram mantidas em piquetes maternidade, permanecendo neste ambiente durante quatro semanas antes do parto. As fêmeas eram monitoradas, no período próximo ao parto, a cada duas horas, para que se evitasse o não acompanhamento do nascimento do bezerro e a mamada do colostro por ele antes da colheita das amostras. Após o parto, as fêmeas eram encaminhadas à sala de ordenha, para obtenção das amostras de colostro.

Todos os bezerros utilizados nesta pesquisa foram imediatamente separados de suas mães após o nascimento e mantidos em piquetes coletivos localizados na propriedade, durante os 15 primeiros dias de vida. Os animais eram alimentados com colostro fornecido em mamadeira, água “ad libitum”, feno e ração no cocho, de forma a acelerar o desenvolvimento dos pré-estômagos e propiciar o desmame aos três meses de vida.

Figura 2 – Galpão das fêmeas bovinas no período pré-parto, sistema “free-stall” em propriedade de leite tipo A utilizada na primeira etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.

Figura 3 – Piquete maternidade, localizado no interior do galpão identificado na Figura 2, em propriedade de leite do tipo A, utilizada na primeira etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.

Figura 4 – Sala de ordenha da Fazenda produtora de leite tipo A, São Paulo, 2011.

3.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram obtidas das fêmeas bovinas adultas logo após o parto, no momento da primeira ordenha, por meio de punção da veia jugular, em tubos siliconizados e com o uso de agulha para múltiplas colheitas (25 mm X 8 mm) do sistema Vacutainer® (Becton Dickinson™, San Diego, CA). Duas alíquotas de sangue foram colhidas, sendo a primeira destinada à determinação das citocinas presentes no soro, utilizando-se para isso, tubos sem anticoagulante. A segunda alíquota foi colhida em tubos contendo heparina sódica (1000 UI), para posterior obtenção dos fagócitos presentes no sangue e determinação dos teores de citocinas.

As amostras de sangue dos bezerros foram obtidas de acordo com os tempos determinados, por meio de punção da veia jugular, usando sistema a vácuo, utilizando-se tubo siliconizado sem anticoagulante com o uso de agulha para múltiplas colheitas (25 mm X 8 mm) do sistema Vacutainer®, para posterior determinação das citocinas presentes no soro. Os tempos determinados para as colheitas das amostras de sangue foram os seguintes:

Tempo 0 (T0): colheita realizada no primeiro dia de vida, antes da ingestão do colostro;

Tempo 1 (T1): colheita realizada com 1 a 2 dias de vida dos animais;

Tempo 2 (T2): colheita realizada com 3 a 4 dias de vida dos animais;

Tempo 3 (T3): colheita realizada com 5 a 6 dias de vida dos animais;

Tempo 5 (T6): colheita realizada com 15 dias de vida dos animais.

Após a colheita, as amostras foram encaminhadas ao laboratório sob refrigeração.

3.5 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE COLOSTRO DAS FÊMEAS BOVINAS

As amostras de colostro provenientes dos quartos mamários das fêmeas bovinas recém paridas foram obtidas antes da primeira ordenha. Nos animais utilizados na primeira etapa, as amostras foram divididas em três alíquotas e na segunda etapa, as amostras foram divididas em duas alíquotas.

A colheita foi precedida de cuidados de anti-sepsia e, para tanto, a glândula mamária e tetos foram higienizados, retirando-se as sujidades com papel toalha e os tetos embebidos em solução de hipoclorito de sódio, e secos individualmente com papel toalha.

A primeira alíquota foi destinada ao exame microbiológico e para isso, realizou-se a desinfecção dos tetos, após a limpeza comum descrita acima, friccionando-se, várias vezes, algodão embebido em solução de álcool 70%, principalmente sobre o orifício do teto. Essa amostra de colostro foi colhida em frasco estéril, mantendo-se uma inclinação de aproximadamente 90° graus em relação ao teto, para evitar a entrada de qualquer sujidade que pudesse contaminar a amostra; e o frasco permaneceu aberto por no máximo cinco segundos, de acordo com recomendações do National Mastitis Council (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981).

A segunda alíquota, destinada a determinação das citocinas presentes no sobrenadante do colostro, foi colhida em frasco estéril do tipo Falcon, com capacidade de 15 mL, sendo que apenas 10 mL da capacidade do tubo foi preenchida com colostro puro.

A terceira alíquota foi obtida apenas nas amostras utilizadas na primeira etapa deste trabalho e foi destinada à obtenção dos fagócitos, para posterior estimulação destes com ECET e mensuração das citocinas. As amostras foram inicialmente colhidas em frascos do tipo Falcon estéril e com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de tampão fosfato salino (PBS), sendo que o mesmo volume de colostro puro foi adicionado ao frasco. Porém, após o processo de centrifugação das amostras no laboratório e determinação da viabilidade celular, cujas técnicas estão descritas

adiante, verificou-se que este volume colhido não era o suficiente para se obter a quantidade desejada de células viáveis (2×10^6 células/mL de colostro), talvez em virtude da distância percorrida entre a propriedade e o laboratório, uma vez que as células são sensíveis aos efeitos térmicos, reduzindo a viabilidade. Portanto, com o objetivo de garantir a quantidade de células necessárias, o volume total de colostro colhido foi ajustado para 400 mL/teto, diluído em igual volume de tampão fosfato salino (PBS) (400 mL), sendo este volume acondicionado em garrafa plástica estéril, com capacidade total de um litro.

Todas as amostras obtidas foram encaminhadas ao laboratório acondicionadas em caixas térmicas e imersas em gelo moído em abundância. A temperatura aproximada de 4°C no interior da caixa térmica reduziu a atividade celular e favoreceu a sobrevivência das células por um tempo mais prolongado.

3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras, após a colheita e encaminhamento ao laboratório, foram analisadas, conforme procedimentos a seguir discriminados.

3.6.1 Exame Microbiológico do colostro

As amostras de colostro destinadas ao exame microbiológico foram semeadas em placa de Petri contendo ágar sangue de ovino á 5% e incubadas a 37°C durante 72 horas. O exame bacterioscópico foi realizado pelo método de Gram, sendo os microrganismos classificados de acordo com Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KRIEG; HOLT, 1984). As técnicas bacteriológicas foram empregadas conforme descrito por Lenette et al. (1985) e Cowan (1985).

3.6.2 Obtenção do soro sanguíneo das fêmeas e bezerros neonatos e separação dos fagócitos mononucleares do sangue das fêmeas bovinas

Após a retração do coágulo, as amostras de sangue colhidas em tubo siliconizado sem anticoagulante, foram centrifugadas, em centrífuga comum, a 730G por 20 minutos. Os soros obtidos foram aliquotados em criotubos com capacidade para 1,5 mL e armazenados em congelador -80°C até o momento do uso, para preservação das citocinas.

O sangue heparinizado obtido das fêmeas bovinas, foi diluído em duas alíquotas de 5 mL e acondicionadas em frascos cônicos estéreis de 15 mL, contendo 5 mL do meio de cultivo celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Vitrocell). O volume final de cada tubo (10 mL), foi delicadamente transferido, utilizando-se pipetas Pasteur estéreis, para um tubo cônico de 50 mL, sobre 5 mL de Ficoll (densidade 1,077) (Ficoll-Paque®, GE Healthcare Bio-Sciences, Buckinghamshire, UK), para separação das células em gradiente de densidade (Figura 5).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 700 G, durante 40 minutos e a 4°C, permitindo a formação de um anel rico em células mononucleares (MN) na interface entre o meio de cultura e o Ficoll-Paque, que foi aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur estéril e acondicionado em novos frascos cônicos de 5 mL, previamente adicionados de 5 mL de RPMI-1640. O volume final foi ajustado para 10 mL, completando-se o volume faltante com meio RPMI-1640. Os tubos foram centrifugados a 400 G, durante 10 minutos, a 4°C.

Após a segunda centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e procedeu-se a lise de eritrócitos presentes nos botões celulares formados no fundo do tubo, utilizando-se, para tanto, 2 mL de NaCl a 0,2%, em cada tubo. Após 20 segundos, 2mL de NaCl a 1,6% foi adicionado e as amostras foram novamente centrifugadas, por 10 minutos, a 4°C e 400G.

O sobrenadante finalmente foi desprezado e o botão celular foi ressuspendido em um mL de RPMI-1640, sendo posteriormente avaliado quanto á viabilidade celular.

Figura 5 – Separação dos fagócitos mononucleares do sangue de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

3.6.3 Obtenção do sobrenadante e separação dos fagócitos do colostro bovino

Os tubos Falcon, contendo 10 mL/teto, de cada uma das amostras de colostro puro colhidas na primeira etapa da pesquisa, foram inicialmente centrifugados a 700G rpm durante 20 minutos à 4°C. Esta velocidade de centrifugação não permitiu a separação do sobrenadante do colostro, pois a camada espessa de gordura presente nas amostras se manteve misturada ao sobrenadante mesmo após a centrifugação. Portanto, após alguns testes realizados, em diferentes velocidades e tempos, a separação do sobrenadante só pôde ser realizada após aliquotar-se 1,0 mL de cada amostra, em tubos do tipo eppendorf, com capacidade de 1,5 mL e centrifugação em centrífuga própria, a 6.000G, durante 30 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, a gordura foi desprezada e o sobrenadante obtido foi aspirado e armazenado em criotubos. Estes foram congelados a -80°C, para preservação das citocinas que foram posteriormente mensuradas.

As amostras que foram colhidas nas garrafas plásticas estéreis, com capacidade para um litro, foram transferidas para tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL, uma vez que para a obtenção dos fagócitos as amostras precisaram ser centrifugadas e não havia, no laboratório, equipamento que comportasse de uma única vez o volume total de colostro colhido e diluído (aproximadamente 800 mL/teto). Portanto, após a transferência do volume total de colostro obteve-se aproximadamente 64 tubos/animal, sendo 16 tubos/teto.

Estes tubos então foram centrifugados, a 700G, durante 15 minutos, a 4°C, permitindo a separação do colostro em três fases nítidas: o precipitado celular, uma porção fluída intermediária e uma camada de gordura, sendo que estas duas últimas foram desprezadas. O precipitado celular foi então ressuspenso em 50 mL de PBS refrigerado e novamente centrifugado. Após a segunda centrifugação, o precipitado celular de todos os tubos foi ressuspenso em 3 mL de meio RPMI-1640, sendo que os volumes correspondentes a cada teto foram transferidos para um único tubo cônico de 50 mL, podendo-se atingir o volume final de até 48 mL de suspensão

celular/teto. A suspensão celular obtida de cada teto foi avaliada quanto à viabilidade celular.

Em razão de o colostro bovino possuir um predomínio de células mononucleares e somente 15% de células polimorfonucleares, não é possível a separação dos fagócitos através da utilização de um gradiente de concentração, mais especificamente o Ficoll-Paque, conforme já descrito por Gomes (2008). Portanto, os testes realizados com os fagócitos do colostro bovino envolveu ambas as células mononucleares e polimorfonucleares.

3.6.4 Avaliação da viabilidade e ajuste do número de células presentes no sangue e colostro bovino

As células presentes no sangue e colostro das fêmeas bovinas foram avaliadas de acordo com a viabilidade. Para tanto, 90 μL da solução do corante Azul de Tripan a 0,1% foi adicionado a 10 μL de cada suspensão celular. Os leucócitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer, utilizando-se os quatro quadrantes dos cantos da área de contagem (4 áreas de 1mm^2 , subdividida em 16 quadrados com área de $1/16\text{mm}^2$), utilizando-se microscopia óptica comum e aumento de 400 vezes (Figura 6). O total de leucócitos contados nos quatro quadrantes correspondeu ao número de células/ mm^3 de sangue ou colostro. Para a conversão e determinação do resultado final, em número de células/mL de sangue ou colostro, utilizou-se a seguinte fórmula: número de células contadas $\times 10 \times 10 \times 1000$, ou seja, multiplicou-se o número de células por 100.000 (10^5). O resultado obtido ainda foi ajustado para 10^6 (DELLA LIBERA, 2002).

As células consideradas viáveis foram aquelas que não se coraram pelo Azul de Tripan. Após a determinação da quantidade de leucócitos viáveis presentes no sangue e colostro das fêmeas bovinas, os volumes das suspensões celulares foram ajustados para que se atingisse a quantidade de 2×10^6 células/mL de sangue ou colostro.

Figura 6 – Fagócitos presentes no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. As células viáveis são as que não foram impregnadas pelo corante Azul de Tripán, São Paulo, 2011.

3.6.5 Preparação do extrato e padronização da concentração bacteriana

Na presente pesquisa foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET), do grupo F5 (K99), gentilmente cedida pelo Prof. Tomomasa Yano, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia da UNICAMP. A cultura estoque de ECET, preservada em glicerol a 15%, foi mantida em congelador -80°C , até o momento de seu cultivo. Para tanto, uma alíquota do material bacteriano preservado, foi transferida, em alça de semeadura, para tubos contendo 5 mL de meio líquido BHI (Brain Heart Infusion - Difco). Os tubos foram então incubados durante 18 horas, em estufa bacteriológica, a 37°C .

Passado o período de 18 horas, os volumes foram transferidos para tubos plásticos estéreis, do tipo Falcon, e centrifugados a 1.500 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado após a centrifugação e o precipitado bacteriano foi ressuscitado em PBS para bactérias. Este procedimento foi repetido por duas vezes, sendo que após a segunda e última centrifugação, o precipitado bacteriano foi ressuscitado em 1 mL de PBS.

A ECET foi então inativada, submetendo-a a temperatura de 56°C, por 60 minutos e a suspensão bacteriana foi então ajustada em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 540nm, para a densidade óptica 0,2. Após o ajuste, as suspensões foram aliqüotadas em criotubos e armazenadas em congelador -80°C.

A concentração bacteriana foi ajustada para 2×10^7 bactérias, calculada através da avaliação da concentração segundo a escala de McFarland. A turbidez da suspensão bacteriana revelou proximidade à escala 2, o que corresponde à quantidade de 6×10^8 bactérias/mL. Portanto, o volume final de 33,3 uL corresponde à concentração de 2×10^7 bactérias.

3.6.6 Obtenção do sobrenadante celular do sangue e colostro das fêmeas bovinas, após estimulação dos fagócitos com ECET

Para a obtenção do sobrenadante celular do sangue e do colostro, foram utilizadas placas de poliestireno de 24 poços (Costar® - Corning, USA). Lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro foram colocadas no fundo dos 24 poços da placa, para posterior aderência das células mononucleares e avaliação da fagocitose destas para a ECET.

Das suspensões celulares obtidas, tanto do sangue quanto do colostro, foram aliqüotados os volumes correspondentes à quantidade de 2×10^6 células/mL, previamente calculados durante a realização da avaliação da viabilidade celular, em tubos cônicos com capacidade para 15 mL, adicionando-se a este volume, meio RPMI-1640, o suficiente para se atingir o volume final de 1 mL/amostra.

Após a acomodação das lamínulas no fundo da placa de 24 poços, 1 mL da suspensão celular de cada amostra (sangue ou colostro) foi delicadamente colocado sobre as lamínulas e em duplicata. A placa foi incubada durante 60 minutos em estufa de CO₂, a 37°C, para a adesão das células na lamínula (Figura 7). Após este período, as suspensões foram aspiradas e armazenadas em criotubos, sendo

identificadas como “células 60 minutos”. Os poços foram então lavados com 1mL de RPMI-1640, para retirada das células que não aderiram à lamínula.

Após, adicionou-se, em cada poço, 1mL de RPMI-1640 e o volume determinado para a concentração de 2×10^7 bactérias/mL de *E.coli* inativada (33 μ L), foi adicionado somente à um poço correspondente à uma alíquota das amostras. Os poços correspondentes à segunda alíquota das amostras permaneceram somente com o meio RPMI e serviram como controle neste tempo de incubação. A placa foi incubada por mais 120 minutos (Figura 8), aspirando-se os sobrenadantes de todos os poços e armazenando-os em criotubos, identificados como “células 120 minutos” e “células + bactérias 120 minutos”.

Os poços então foram lavados com 1mL de RPMI-1640 (90%) e soro fetal bovino (10%), para a retirada das colônias bacterianas que não foram fagocitadas. A reação foi interrompida adicionando-se 200 μ L de solução de glutaraldeído a 0,5%, em todos os poços.

Os sobrenadantes obtidos após os 60 e 120 minutos de incubação e que foram aliquoteados em criotubos foram armazenados em congelador -80°C , para a posterior mensuração das citocinas IL- 1β , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

Figura 7 – Esquema de preenchimento da placa de cultivo celular de 24 poços, contendo as suspensões celulares, antes dos primeiros 60 minutos de incubação, São Paulo, 2011.

Figura 8 - Esquema de preenchimento da placa de cultivo celular de 24 poços, contendo a suspensão bacteriana (ECET), antes dos 120 minutos de incubação, São Paulo, 2011.

3.6.7 Efeito da *Escherichia coli* enterotoxigênica sobre os fagócitos presentes no sangue e colostro das fêmeas bovinas

Posteriormente à interrupção da fagocitose pelo glutaraldeído, as lamínulas foram delicadamente retiradas das placas e colocadas sobre lâminas de vidro, onde foram fixadas e posteriormente coradas com Rosenfeld (1947). As lâminas foram avaliadas quanto à morfologia e presença de partículas de *Escherichia coli* engolfadas no interior dos fagócitos, em microscopia óptica, em aumento de 1000x em óleo de imersão (SANCHES, 2008). A identificação da fagocitose, observada nas avaliações das lamínulas, foi realizada com a finalidade de se relacionar este processo a uma possível estimulação dos fagócitos do sangue e colostro pela ECET e consequentemente, uma liberação de citocinas produzidas pelos fagócitos no sobrenadante do cultivo celular.

3.6.8 Determinação das concentrações de citocinas

A dosagem das citocinas foi realizada por meio da utilização de kits comerciais, pelo método de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). Este método é específico e altamente sensível para quantificação das citocinas presentes em diferentes soluções.

Em virtude das dificuldades encontradas na obtenção dos kits específicos para a espécie bovina, tanto com relação ao elevado preço quanto pela ausência de um mesmo kit para cada uma das citocinas utilizadas neste trabalho, adotou-se o kit formulado para a espécie humana, das marcas GE HealthCare® - Buckinghamshire, UK (IL-1 β Human Biotrak Easy ELISA; IL-6 Human Biotrak Easy ELISA; IFN- γ Human Biotrak Easy ELISA e TNF- α Human Biotrak Easy ELISA) e BD Biosciences® – San Diego, CA, USA (Human IL-1 β ELISA Set II; Human IL-6 ELISA Set e Human TNF- α

ELISA Set), já que citocinas de diferentes espécies podem ser homólogas, se a sequência de aminoácidos da citocina da segunda espécie tiver pelo menos 60% de identidade com os aminoácidos da citocina da primeira espécie, sendo este fato observado em 47 citocinas, incluindo as analisadas nesta pesquisa (Scheerlinck, 1999).

As citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ foram dosadas no soro das vacas e bezerros, no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas, assim como no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue e do colostro das fêmeas.

O princípio do teste de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) baseou-se na presença de um anticorpo monoclonal anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-TNF- α e anti-INF- γ , conforme a especificidade do kit em questão, distribuídos nos poços das placas. As citocinas presentes nas amostras ou no padrão se ligaram aos anticorpos adsorvidos aos micropoços. A biotina conjugada (anticorpo monoclonal anti-citocina) se ligou à citocina capturada pelo primeiro anticorpo. A estreptavidina-HRP se ligou à biotina conjugada anti-citocina. Após a incubação, a biotina conjugada e a estreptavidina-HRP foram removidas durante a etapa da lavagem (lavadora automática – Clean Up, Microplate Washer, ALKA Technologies, São Paulo, Brasil) e a solução substrato reativa com HRP foi adicionada aos poços. Um produto colorido foi formado com a intensidade da cor proporcional à quantidade de citocina presente nas amostras. A reação foi finalizada pela adição da solução de parada (ácido fosfórico 1M) e a absorbância lida em 450nm. Uma curva padrão foi preparada a partir de sete diluições padrões e a concentração das citocinas presentes nas amostras foi determinada, com os resultados sendo apresentados em pg/mL.

Para a determinação da concentração das citocinas, utilizou-se o leitor de ELISA modelo ELX-808, da marca Biotek Instruments®, Winooski, USA e o software Gen5®.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos segundo as variáveis estudadas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os valores das citocinas do soro e colostro apresentaram distribuição não paramétrica, as medianas de cada parâmetro foram calculadas e as diferenças obtidas foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney, para a comparação entre duas variáveis e Kruskal-Wallis, quando comparou-se mais de duas variáveis (SAMPAIO, 1998).

Os valores das concentrações de citocinas determinadas no sobrenadante de cultivo de células mononucleares do sangue e colostro, assim como os valores relativos das células mononucleares do sangue e colostro apresentaram distribuição paramétrica e foram submetidas a análise de variância, com as diferenças avaliadas pelo teste de Tukey (SAMPAIO, 1998).

As análises foram processadas com o auxílio do programa estatístico computadorizado (MINITAB, 2000).

5 RESULTADOS

Em virtude do vasto tempo necessário á obtenção do soro sanguíneo e sobrenadante do colostro; separação dos fagócitos do sangue e do colostro; avaliação da viabilidade celular; preparo do extrato e padronização da concentração bacteriana; realização do cultivo celular, obtenção dos sobrenadantes deste cultivo celular e leitura das lâminas confeccionadas após a realização do cultivo celular, nas amostras de sangue e colostro das 22 fêmeas bovinas, o presente trabalho necessitou ser dividido em duas etapas, conforme anteriormente explicado no tópico Material e Métodos.

As determinações descritas acima, portanto pertenceram á primeira etapa da pesquisa, sendo que na segunda etapa realizou-se a quantificação das citocinas no sobrenadante do colostro de 11 fêmeas bovinas da raça Holandesa, e no soro sanguíneo dos seus conceptos, para verificação da transferência destas citocinas pelo colostro.

Os resultados, portanto, foram divididos conforme as etapas metodológicas e apresentados a seguir.

5.1 PRIMEIRA ETAPA

O exame microbiológico foi realizado nas 88 amostras de colostro obtidas na primeira etapa do experimento. A porcentagem de amostras positivas ao exame bacteriológico foi de 6,81% na primeira etapa (n=6), conforme apresentado no Gráfico 1. O micro-organismo isolado nas amostras positivas foi o *Staphylococcus* coagulase-negativa.

As amostras que apresentaram crescimento bacteriológico foram eliminadas da pesquisa.

Gráfico 1 – Porcentagens de amostras positivas e negativas ao exame bacteriológico do colostro bovino utilizado na primeira etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.

5.1.1 Citocinas presentes no soro sanguíneo das fêmeas bovinas

As concentrações das citocinas foram determinadas no soro sanguíneo, conforme resultados apresentados na Tabela 1 e Gráfico 2.

Os valores medianos obtidos no soro, para as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α foram de, respectivamente 70,5; 86,1; 41,0 e 139,9 pg/mL.

Não houve diferença significativa entre os valores medianos das citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , entretanto, observou-se um maior valor na concentração de TNF- α , quando comparado ao IFN- γ ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

Parâmetros / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α
Média + Desvio padrão	134,6 $\pm$ 128,1	92,5 $\pm$ 74,9	64,7 $\pm$ 64,2	168,7 $\pm$ 126,8
Mediana	70,5 ^{ab}	86,1 ^{ab}	41,0 ^b	139,9 ^a
Valor mínimo	10,5	15,4	18,7	10,4
Valor máximo	333,10	192,1	271,5	462,8

a, b – valores medianos com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si

Gráfico 2 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011

5.1.2 Citocinas presentes no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas

Com relação às concentrações das citocinas presentes no sobrenadante do colostro e apresentadas na Tabela 2 e Gráfico 3, os valores medianos encontrados, para as citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ foram 41,5; 13,5; 57,9 e 20,8, respectivamente. Verificou-se que os valores medianos de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ não diferiram estatisticamente entre si, enquanto que os valores de IL-1 β e IFN- γ foram maiores que o valor de TNF- α ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Tabela 2 - Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

Parâmetros / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α
Média + Desvio padrão	81,8 $\pm$ 76,2	43,1 $\pm$ 46,1	78,0 $\pm$ 62,4	26,1 $\pm$ 26,2
Mediana	41,5 ^a	13,5 ^{ab}	57,9 ^a	20,8 ^b
Valor mínimo	9,2	10,1	10,0	10,4
Valor máximo	207,1	111,2	195,3	184,9

a, b – valores medianos com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si

Gráfico 3 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

Comparando-se as concentrações das citocinas presentes no soro sanguíneo e no sobrenadante do colostro, verificou-se que houve diferença apenas nas concentrações de TNF- α , com valores superiores sendo encontrados no soro (Tabela 3 e Gráfico 4).

Tabela 3 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e sobrenadante de colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

Parâmetros / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α
Soro sanguíneo	70,5	86,1	41,0	139,9 ^A
Sobrenadante colostro	41,5	13,5	57,9	20,8 ^B
Significância	p=0,06	p=0,06	p=0,03	p<0,0001

A, B – médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si

Gráfico 4 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo e sobrenadante de colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

5.1.3 Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo de fagócitos mononucleares do sangue das fêmeas bovinas

Os valores médios e desvios-padrão das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α foram calculados no sobrenadante de cultivo dos fagócitos mononucleares do sangue das fêmeas bovinas, após a incubação das placas de cultivo celular aos 60 e 120 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 4 e Gráfico 5.

Os tempos de incubação foram comparados entre si, não sendo observadas diferenças nas concentrações das citocinas obtidas nestas determinações.

Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sangue de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.

Tempo de incubação / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	Significância
Células 60 minutos	1,16 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 2,0	2,9 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 5,1	p=0,60
Células 120 minutos	1,7 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 5,1	2,7 $\pm$ 2,1	7,2 $\pm$ 6,0	p=0,42
Células + bactérias 120 minutos	2,8 $\pm$ 1,0	6,7 $\pm$ 11,5	4,6 $\pm$ 0,8	7,9 $\pm$ 8,1	p=0,16
Significância	p=0,1	p=0,5	p=0,4	p=0,87

Gráfico 5 – Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sangue de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.

5.1.4 Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo de fagócitos do colostro das fêmeas bovinas

Os valores médios e desvios-padrão das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α foram calculados no sobrenadante de cultivo dos fagócitos do colostro das fêmeas bovinas, após a incubação das placas de cultivo celular aos 60 e 120 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e Gráfico 6.

Os tempos de incubação foram comparados entre si, não sendo observadas diferenças nas concentrações das citocinas obtidas nestas determinações.

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.

Tempo de incubação / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	Significância
Células 60 minutos	1,5 $\pm$ 1,2	4,3 $\pm$ 5,5	2,7 $\pm$ 2,2	4,5 $\pm$ 6,7	p=0,5
Células 120 minutos	1,6 $\pm$ 1,7	5,3 $\pm$ 7,8	2,9 $\pm$ 1,9	6,7 $\pm$ 6,0	p=0,06
Células + bactérias 120 minutos	4,2 $\pm$ 4,8	6,9 $\pm$ 9,9	3,5 $\pm$ 2,6	8,5 $\pm$ 11,6	p=0,12
Significância	p=0,12	p=0,93	p=0,76	p=0,21

Gráfico 6 – Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os diferentes tempos de incubação do cultivo celular, São Paulo, 2011.

Apesar de não haver diferenças entre os valores médios das citocinas obtidas após o cultivo celular dos fagócitos, pode-se observar que houve uma tendência no aumento destes valores com o avançar do tempo de incubação das amostras e estímulo celular pela presença de *E.coli*.

5.1.5 Relação entre as citocinas do sobrenadante do colostro e os quartos mamários

Avaliando-se os valores mediados das citocinas com os quartos mamários das fêmeas bovinas, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das quatro citocinas avaliadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com os quartos mamários, São Paulo, 2011.

Quarto mamário / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α
AD	8,8	2,7	39,35	24,0
PD	25,5	13,0	108,45	19,9
AE	17,2	6,6	44,45	25,4
PE	12,8	7,5	78,75	16,3
Significância	p=0,77	p=0,67	p=0,72	p=0,24

5.1.6 Relação entre as citocinas do soro sanguíneo e sobrenadante do colostro com o número da lactação

Os valores médios das concentrações de citocinas presentes no soro das vacas da raça Holandesa foram de 98,3; 88,4; 53,5 e 235,9 pg/mL, para IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , respectivamente. Com relação às novilhas, os valores médios foram de 144,5; 94,5; 83,9 e 116,2 pg/mL, respectivamente para as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

Quanto aos valores médios comparados entre os grupos vacas e novilhas, não foram observadas diferenças nas concentrações das citocinas presentes no soro sanguíneo (Tabela 7 e Gráfico 7).

Tabela 7 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF α no soro sanguíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com o número da lactação, São Paulo, 2011.

Parâmetros / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α
Vaca	98,3 $\pm$ 124,6	88,4 $\pm$ 78,6	53,5 $\pm$ 45,8	235,9 $\pm$ 153,7
Novilha	144,5 $\pm$ 140,8	94,5 $\pm$ 85,3	83,9 $\pm$ 88,5	116,2 $\pm$ 125,0
Significância	p=0,28	p=0,46	p=0,16	p=0,06

Gráfico 7 – Valores médios das concentrações (pg/mL) das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no soro sanguíneo de vacas e novilhas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

Os valores médios das concentrações de citocinas (pg/mL) presentes no colostro das vacas foram de 97,4; 21,3; 143,3 e 35,1 pg/mL, para as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , respectivamente. No colostro das novilhas, os valores obtidos para as mesmas citocinas foram 69,5; 6,4; 51,9 e 16,32 pg/mL.

Quando se comparou os dois grupos analisados verificou-se que os valores médios de IFN- γ e TNF- α foram significativamente maiores nas vacas (p=0,003 e p=0,001), respectivamente (Tabela 8 e Gráfico 8).

Tabela 8 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, de acordo com o número de lactações, São Paulo, 2011.

Parâmetros / Citocinas	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α
Vaca	97,4 $\pm$ 80,4	21,3 $\pm$ 41,2	143,3 $\pm$ 9,3 ^A	35,1 $\pm$ 38,9 ^A
Novilha	69,5 $\pm$ 69,1	6,4 $\pm$ 5,1	51,9 $\pm$ 54,4 ^B	16,32 $\pm$ 7,9 ^B
Significância	p=0,17	p=0,18	p=0,003	p=0,001

A, B – valores médios com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

Gráfico 8 – Valores médios das concentrações (pg/mL) das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no sobrenadante do colostro de vacas e novilhas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

5.2 SEGUNDA ETAPA

O exame microbiológico foi realizado nas 44 amostras de colostro obtidas na segunda etapa da pesquisa. A porcentagem de amostras positivas ao exame bacteriológico foi de 29,5% (n=13), conforme apresentado no Gráfico 9. Os microorganismos isolados nas amostras pertencentes á esta etapa foram o *Staphylococcus* coagulase-negativa e a *Escherichia coli*. As amostras de colostro que apresentaram resultado positivo ao exame bacteriológico foram excluídas da pesquisa.

Gráfico 9 - Porcentagens de amostras positivas e negativas ao exame bacteriológico do colostro bovino utilizado na segunda etapa da pesquisa, São Paulo, 2011.

5.2.1 Citocinas presentes no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas

Com relação aos valores medianos obtidos para as concentrações das citocinas presentes no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas utilizadas na segunda etapa da pesquisa, verificou-se que não houve diferença significativa entre as três citocinas avaliadas (Tabela 9 e Gráfico 10).

Tabela 9 - Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

Parâmetros / Citocinas	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Média + Desvio padrão	33,4 $\pm$ 2,6	46,0 $\pm$ 43,1	80,0 $\pm$ 86,6
Mediana	34,0	31,3	39,2
Valor mínimo	29,9	10,5	10,0
Valor máximo	36,0	149,5	264,0

Gráfico 10 – Valores médios das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, São Paulo, 2011.

5.2.2 Citocinas presentes no soro sanguíneo dos bezerros neonatos

As concentrações das citocinas presentes no soro sanguíneo dos bezerros neonatos foram determinadas conforme com os dias de vida destes animais, correspondendo, portanto, aos tempos de colheita **T0** (antes da ingestão do colostro), **T1** (um a dois dias de vida), **T2** (três a quatro dias de vida), **T3** (cinco a seis dias de vida) e **T6** (quinze dias de vida).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12 e Gráfico 12, verificou-se aumento crescente dos valores medianos das citocinas até o T2, em seguida, os valores foram decrescentes e indetectáveis aos quinze dias de vida. No caso da citocina TNF- α , esta não foi detectada a partir do T3. Os valores medianos correspondentes às concentrações das diferentes citocinas, avaliadas em um mesmo tempo, não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 10 e Gráfico 11).

Tabela 10 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro sanguíneo dos bezerros neonatos, de acordo com os tempos das colheitas relacionados às idades dos animais, São Paulo, 2011.

Tempos das colheitas	IL-1 β	IL-6	TNF- α	Significância
T0	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	p=0,34
T1	1,75 ^{AB}	1,08 ^{AB}	2,30 ^{AB}	p=0,47
T2	4,29 ^A	3,80 ^A	6,20 ^A	p=0,8
T3	1,93 ^B	1,66 ^B	0,0 ^B	p=0,43
T6	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	p=0,38
Significância	P=0,0004	P<0,05	P=0,0003

Gráfico 11 – Valores medianos das concentrações (pg/mL) de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro sanguíneo de bezerros neonatos, de acordo com os tempos das colheitas, São Paulo, 2011.

6 DISCUSSÃO

O colostro bovino é estudado há décadas, pela sua composição imunológica e fornecimento de alimento aos neonatos (PAAPE et al., 1991; SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997; BOUTINAUD, JAMMES, 2002; PAAPE et al., 2002; KELLY, 2003; RAINARD, RIOLLET, 2006; STELWAGEN et al., 2008). No entanto, ainda existem muitas indagações sobre a função de alguns componentes imunológicos, tais como as citocinas e os leucócitos do colostro, na imunidade dos bezerros nas primeiras quatro semanas de vida, que corresponde ao período de maior susceptibilidade às doenças (CHASE, HURLEY, REBER, 2008; CORTESE, 2009).

Muitos trabalhos foram realizados para determinação da concentração de imunoglobulinas no colostro bovino, assim como sua função na transferência de imunidade passiva e imunidade de bovinos recém-nascidos e jovens (BENESI, 1993; RIEDEL-CASPARI, SCHMIDT, 1993; FEITOSA et al., 2001; HAGIWARA et al., 2001). Adicionalmente às imunoglobulinas, os leucócitos presentes no colostro, principalmente aqueles presentes na secreção colostrar de primeira ordenha, são altamente viáveis, transferidos pelo colostro materno e absorvidos pela mucosa intestinal do neonato, atuando como um componente de aprimoramento da defesa imunológica imatura destes animais. Alguns autores sugeriram que estas células possuem a capacidade de produzir citocinas, mediante o reconhecimento de um antígeno, potencializando a resposta imune dos bezerros nos primeiros dias de vida (RIEDEL-CASPARI, SCHMIDT, 1993, YAMANAKA et al., 2001; GOTO et al., 1997).

Gomes (2008) concluiu que o colostro bovino de primeira ordenha pode conter até 878.466 células/mL, sendo que, nos neonatos alimentados adequadamente com colostro, ou seja, em torno de quatro litros ministrados nas primeiras doze horas de vida, a quantidade de células transferidas seria de aproximadamente 3,5 bilhões de células/4 litros de colostro. Como o colostro bovino de primeira ordenha possui muitas células viáveis, certamente esta grande quantidade não está relacionada somente à proteção imunológica da glândula mamária, mas também confere

proteção ao neonato. Sabe-se que 16 a 30% destas células são linfócitos, que possuem memória imunológica e responde mais rapidamente aos antígenos e produzem citocinas (BARRINGTON, PARISH, 2001; GOMES, 2008).

Diante da diversidade de funções das citocinas, assim como sua interação com as células do sistema imune, as pesquisas atuais buscam a elucidação do papel que elas desempenham no colostro e conseqüentemente na resposta imunológica dos bezerros neonatos. Algumas indagações puderam ser respondidas neste trabalho: foi possível determinar a concentração das citocinas pró-inflamatórias presentes no sangue e colostro de fêmeas bovinas, assim como comprovar a sua absorção pelos neonatos após ingestão de colostro bovino “fresco”. Adicionalmente, foi possível verificar que as células do colostro bovino podem secretar estas substâncias mediante liberação espontânea ou por meio de estimulação com a *E.coli*. Além dos objetivos previamente estabelecidos, foi possível verificar que a idade das vacas estudadas está relacionada à quantidade de citocinas presentes no colostro de primeira ordenha.

6.1 Citocinas presentes no soro sanguíneo e sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas

Os valores medianos das citocinas presentes no soro sanguíneo e sobrenadante do colostro foram obtidos por meio da utilização de kits comerciais do tipo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), das marcas GE[®] e BD[®]. Em virtude da dificuldade em se encontrar, em uma mesma empresa, kits para a espécie bovina, além do alto tempo para importação e baixo prazo de validade dos kits (3 meses), optou-se neste trabalho, por utilizar kits para a espécie humana. Segundo Scheerlinck (1999), a homologia entre citocinas de diferentes espécies pode ser confirmada quando existir, entre elas, pelo menos 60% de similaridade na seqüência de aminoácidos. Particularmente para a IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , citocinas

avaliadas neste trabalho, a homologia do bovino com humanos é de 65%, 68%, 60,8% e 77%, respectivamente.

Mesmo apresentando homologias entre as citocinas de humanos, as concentrações obtidas neste trabalho, tanto no soro sanguíneo quanto no sobrenadante do colostro bovino foram inferiores aos obtidos em outros trabalhos (GOTO et al., 1997; HAGIWARA et al., 2000; HISAEDA et al., 2001; BANNERMAN et al., 2008; RAZAVI et al., 2010). Apesar disso, o que se pode verificar também é que os valores das citocinas diferem muito entre os trabalhos analisados.

Goto et al. (1997) determinaram as concentrações da citocina IL-1 β no soro e colostro de fêmeas sadias da raça Holandesa através do teste de ensaio imunossorvente ligado à enzima e encontrou valores médios, no soro, de 2.000 pg/mL e no colostro, de 3.500 pg/mL, superiores aos valores medianos obtidos no presente estudo, que foi de 70,5 pg/mL no soro e 41,5 pg/mL no colostro. Entretanto, estes autores avaliaram as concentrações da IL-1 β em amostras de soro e sobrenadante do leite, no período compreendido de 20 dias antes a 14 dias após o parto em vacas lactantes e gestantes, bezerras de 0 a 180 dias de vida e bezerras de até um ano de idade. As maiores concentrações da citocina IL-1 β no soro, foram atribuídas ao período que coincide com a ovulação (10 semanas após o parto), havendo uma provável reação inflamatória no local e secreção da citocina pelos leucócitos.

Hagiwara et al. (2000) utilizaram kits de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) para bovinos, para determinar as concentrações de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Os autores encontraram os valores médios de 8.440,2 $\pm$ 2.990,0; 770,0 $\pm$ 310,5; 9.260,5 $\pm$ 461,8 e 2.610,3 $\pm$ 59,0 pg/mL, respectivamente para as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . Estes valores foram superiores aos obtidos neste trabalho, onde foram encontrados os valores medianos de 41,5; 13,5; 57,9 e 20,8 pg/mL. Entretanto, neste trabalho os autores utilizaram citocinas purificadas, que foram utilizadas como imunógenos e consequentemente estimularam as células a secretarem maior quantidade dessa substância, o que não foi realizado no presente trabalho.

Hisaeda et al. (2001), determinaram os valores de IFN- γ e TNF- α no soro e colostro de vacas sadias e naturalmente acometidas com mastite causada por *E. coli*, através da utilização de kits baseados no método ELISA sanduíche, usando IgGs purificadas e específicas para a espécie bovina. No soro e colostro de vacas sadias, os valores médios de IFN- γ foram tão baixos que não puderam ser mensurados, e o TNF- α foi encontrado em concentração menor que 1000 pg/mL. Já nas fêmeas portadoras de mastite, o valor médio no soro de IFN- γ foi de aproximadamente 40.000 pg/mL e no colostro, o valor médio obtido foi de 20.000 pg/mL.

Azedo (2010) determinou a concentração das citocinas IFN- γ e TNF- α no soro de vacas soronegativas para o vírus da leucose enzoótica bovina, utilizando kits de Elisa para bovinos (Bovine IFN- γ ELISA kit - Invitrogen®, USA). O autor não especificou qual foi o kit utilizado para a quantificação de TNF- α . Os resultados obtidos foram inferiores aos encontrados neste trabalho, para ambas as citocinas, entretanto, os animais utilizados no trabalho do referido autor eram comprovadamente soronegativas para a Leucose Enzoótica dos Bovinos. No presente trabalho, a pesquisa sorológica para esta enfermidade não foi avaliada, e os animais foram selecionados pelo exame físico.

Vários podem ser os fatores que interferem na produção das citocinas, uma vez que estas proteínas apresentam particularidades e efeitos nos organismos ainda parcialmente esclarecidos. As citocinas são de vida curta, possuem estruturas e receptores altamente diversificados, podem agir tanto local quanto sistemicamente e possuem ação pleiotrópica, afetando diferentes tipos celulares (TIZARD, 2008). Estes fatores podem estar envolvidos á grande variabilidade encontrada nas concentrações de uma mesma citocina estudada em diferentes populações, identificada através das diferenças notadas entre os trabalhos já existentes na literatura. Além disso, pôde-se verificar neste trabalho, que houve variações entre os valores obtidos para uma mesma população estudada, através da alta variabilidade existente entre os valores mínimos e máximos das concentrações de citocinas, tanto no soro sanguíneo quanto no sobrenadante do colostro.

Nas amostras analisadas neste trabalho, verificou-se que no soro, a citocina predominante foi o TNF- α e no colostro, o IFN- γ ($p < 0,05$). O IFN- γ é uma potente citocina ativadora de macrófagos e a presença de aproximadamente 60% deste tipo leucocitário no colostro (GOMES, 2008) podem elucidar o fato aqui encontrado, já que no sangue a proporção destas células é pequena.

Goto et al. (1997) e Hagiwara et al. (2000) detectaram a presença do RNAm para a IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α nas células isoladas do colostro bovino, mesmo na ausência de qualquer agente estimulante, indicando a possibilidade desta citocina poder ser produzida localmente, na glândula mamária, com expressões mais significativas ocorrendo durante os últimos dias de gestação.

Adicionalmente, as variações nas concentrações das citocinas encontradas entre os diferentes trabalhos podem ainda estar envolvidas a fatores relacionados ao manejo do animal e ao ambiente onde são mantidos, entre eles o manejo sanitário e nutricional das fêmeas bovinas, refletindo diretamente na quantidade de células presentes e na qualidade do colostro, variando a produção das citocinas por estas células.

O mecanismo que envolve a síntese das citocinas na glândula mamária ainda não foi completamente elucidado, porém, a expressão do RNAm para as citocinas no tecido e secreções mamárias clareia a possibilidade de que estas possam ser produzidas pelas células do colostro e do leite, independentemente de um estímulo (HAGIWARA et al., 2000).

6.2 Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo de fagócitos mononucleares do sangue e colostro das fêmeas bovinas

Esta análise foi realizada para verificar a produção de citocinas pelos fagócitos mononucleares do sangue e colostro por liberação espontânea ou pela estimulação com a ECET. As suspensões celulares contendo os fagócitos mononucleares do sangue e os fagócitos totais do colostro bovino, contendo a quantidade de 2×10^6 células/mL foram incubadas, em placas de cultivo celular, durante 60 minutos, a 37°C , para aderência das células mononucleares às lamínulas de vidro colocadas no interior dos poços das placas de cultivo, conforme metodologia descrita por Sanches (2008). Decorridos estes sessenta minutos, as suspensões celulares foram removidas e aliquotadas em tubos plásticos estéreis. Estas amostras foram identificadas como sendo “células 60 minutos”. As placas de cultivo foram então lavadas e suspensões contendo a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET), na quantidade de 2×10^7 bactérias/mL foram adicionadas nos poços, sobre as lamínulas. As placas foram novamente incubadas, para a realização da fagocitose da ECET pelos fagócitos, durante 120 minutos, a 37° , conforme procedimento descrito no Material e Métodos.

Após os 120 minutos, as suspensões celulares foram aspiradas dos poços e aliquotadas, da mesma forma que nos primeiros 60 minutos. Como o tempo de 120 minutos envolvia a realização da fagocitose e utilização da ECET, os poços das placas de cultivo celular foram preenchidos em duplicata, para que se pudesse ter um grupo de amostras controle. A estes dois grupos foram atribuídas as denominações “células 120 minutos” e “células + bactérias 120 minutos”, conforme apresentado nos Resultados.

As citocinas IL- 1β , IL-6, IFN- γ e TNF- α foram mensuradas nestas suspensões celulares, tanto do sangue quanto do colostro bovino. Os três tempos das incubações realizadas - células 60 minutos, células 120 minutos e células 120 minutos + bactérias - foram aplicados nas amostras de sangue e colostro, ou seja,

cada animal gerou um total de 15 sobrenadantes, considerando-se os três tempos do sangue + doze tempos do colostro (quatro quartos mamários). Nesta etapa, foram utilizadas 22 fêmeas bovinas, realizando-se a dosagem das quatro citocinas em cada sobrenadante obtido no cultivo celular, portanto, pode-se concluir que um total de 1320 alíquotas foram mensuradas (15 tempos x 22 animais x 4 citocinas).

Não foram observadas diferenças nas concentrações das citocinas produzidas em nenhum dos tempos de cultivo avaliados, assim como não houve diferenças entre as concentrações das citocinas, quando se avaliou o mesmo tempo de cultivo. Entretanto, apesar de não haver diferença, verificou-se que houve um aumento progressivo no valor médio das concentrações das quatro citocinas avaliadas, em relação ao tempo maior de incubação e presença da suspensão de ECET, correspondendo ao tempo de incubação denominado “células + bactérias 120 minutos”.

O protocolo original de cultivo celular que seria utilizado inicialmente neste trabalho, envolvia os mesmos procedimentos relacionados à quantidade e forma de preparo das suspensões celulares do protocolo adotado e relatado na metodologia original deste trabalho, assim como a disposição destas nas placas de cultivo celular. A diferença para o protocolo final utilizado seria de um tempo de incubação das placas de até 72 horas, conforme realizado também por alguns autores (YAMANAKA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2003a). Dentre deste tempo, os sobrenadantes seriam obtidos das placas de cultivo em 12, 20, 24, 48 e 72 horas, onde seria possível a quantificação das citocinas nestes tempos e determinação da cinética destas no soro e colostro bovino. Porém, após várias tentativas de incubação, verificou-se que as placas de cultivo celular apresentavam contaminação bacteriana já nas primeiras 24 horas, por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, certamente de origem ambientais, uma vez que a cepa de *E. coli* utilizada para este procedimento era previamente inativada por uma hora, a 60°C. Esta dificuldade é reflexo da colheita trabalhosa das amostras de colostro das vacas e novilhas imediatamente ao parto, que muitas vezes foi realizada no piquete maternidade a pedido do responsável pelos animais. Além disso, o volume obtido para obtenção

dos fagócitos era de 400mL, que aumentou a chance de contaminação desta amostra por bactérias ambientais.

Em virtude disto, o protocolo de cultivo celular foi alterado para um tempo de incubação máxima de 120 minutos, o mesmo utilizado por Sanches (2008), que avaliou a função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos do sangue de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina ao *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

A confirmação da fagocitose pelas células mononucleares do sangue e colostro provenientes das amostras obtidas no presente estudo foi determinada, para todas as amostras, através da avaliação morfológica dos fagócitos aderidos e identificação das partículas bacterianas no interior do citoplasma dos fagócitos, nas lamínulas dispostas nos poços das placas de cultivo celular e coradas com corante de Rosenfeld (1947), após decorrido o tempo de 120 minutos

A hipótese envolvida para a avaliação das citocinas no sobrenadante do cultivo celular seria a de que, se os fagócitos do sangue e colostro bovino fagocitavam as partículas de ECET dentro de duas horas, estas células estariam reconhecendo o LPS presente na parede celular bacteriana, através dos receptores Toll-like (TLR) do tipo 4. Em seguida, o micro-organismo seria engolfado pela emissão de pseudópodes, levado para dentro do fagócito e destruído, através de mecanismos enzimáticos e dependentes de oxigênio. Esta destruição microbiana levaria á alterações nos fagócitos e levando a produção de citocinas (TIZARD, 2008; ABBAS; LICHTMAN, 2005; DOAN et al., 2008). Entretanto, nas amostras avaliadas verificou-se que o tempo de incubação de duas horas foi suficiente para a produção de citocinas pelas células em níveis basais, uma vez que mesmo nas células incubadas com *E.coli* os valores das concentrações não diferiram dos tempos de incubação sem a bactéria.

Alguns trabalhos envolvendo a realização de cultivo celular e determinação das citocinas foram realizados, sendo que o tempo de incubação utilizados nestes trabalhos foi superior ao tempo determinado neste estudo (OKADA et al., 1997; YAMANAKA et al., 2003a).

Okada et al. (1997) realizou cultivo de células mamárias de vacas lactantes, para avaliar a capacidade destas em produzir IL-1, IL-6 e TNF- α , além de expressar os RNAs para estas citocinas e verificou que a atividade da citocina IL-1 β só foi observada após a adição de um meio de cultura estimulador das células epiteliais. No caso da IL-6, a atividade desta citocina foi observada somente após 24 horas do início da obtenção dos sobrenadantes do cultivo celular e a atividade da TNF- α não foi visualizada em nenhum dos tempos e meios avaliados. Adicionalmente, os RNAs das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram detectados no cultivo de células epiteliais mamárias estimuladas ou não. Estes achados vão de encontro ao verificado no presente trabalho, ou seja, as citocinas são produzidas pelas células mamárias, mas a intensidade desta produção dependerá da qualidade e do tempo de contato com o agente estimulador.

6.3 Relação entre as citocinas do soro sanguíneo e sobrenadante do colostro com os quartos mamários e o número da lactação

Apesar deste tópico não estar incluído nos objetivos originalmente propostos, optou-se por acrescentá-lo, em função da relevância dos resultados encontrados.

Os valores médios das concentrações das citocinas do soro e sobrenadante do colostro foram comparados de acordo com os quartos mamários, sendo que não foram observadas diferenças estatísticas entre estas variáveis. O mesmo fenômeno foi observado por Gomes et al. (2011) quando procuraram diferenciar as concentrações de imunoglobulinas entre os quartos mamários. Esta similaridade entre componentes do colostro bovino em todos os quartos mamários, mais especificamente entre as imunoglobulinas e citocinas, pode ser considerada importante quando se deseja estabelecer delineamentos experimentais visando avaliar estes componentes no colostro ou leite bovino. Especificamente no presente trabalho, a obtenção da quantidade ideal de fagócitos viáveis só foi possível após a

colheita de 400 mL de colostro/teto, obtendo-se, portanto um valor total de 1600 mL de colostro/fêmea bovina, conforme explicado no tópico Material e Métodos. Esta grande quantidade necessária pode comprometer a qualidade das amostras, predispondo-as à contaminação ambiental, além de poder prejudicar o manejo da ordenha da propriedade. A não diferença entre os quartos mamários de vacas híginas possibilita a obtenção de amostras de apenas um destes quartos mamários, minimizando o volume de colostro obtido.

Em propriedades de criação extensiva, onde o monitoramento da ingestão de colostro pelo neonato é difícil, a similaridade entre os quartos mamários possibilitaria a obliteração com tampões específicos de apenas um teto, liberando os restantes para a mamada pelo neonato, e facilitaria a avaliação da qualidade do colostro em pesquisas futuras, uma vez que a quantidade de imunoglobulinas e citocinas do colostro não diferiram em função do quartos mamários de origem.

Quando as concentrações das citocinas IFN- γ e TNF- α foram comparadas com o número da lactação dos animais estudados, verificou-se, que no colostro das vacas, os valores médios destas concentrações foram maiores do que os observados nas novilhas, com valores médios e desvios-padrão de $143,3 \pm 9,3$ e $51,9 \pm 54,4$, para a IFN- γ e $35,1 \pm 38,9$ e $16,32 \pm 7,9$ para o TNF- α . No sangue não foram observadas diferenças entre os dois grupos avaliados.

A maior concentração das citocinas IFN- γ e TNF- α no colostro de vacas foi semelhante ao observado por Pritchett et al. (1991) e Gomes et al. (2011), que identificaram uma maior concentração de imunoglobulinas em vacas com mais de duas lactações. Portanto, acredita-se que o maior número de exposição antigênica das mães com maior número de lactação seria o responsável por estas variações na qualidade do colostro. Assim, fazendas como a propriedade usada na primeira etapa desta pesquisa, que separam o bezerro imediatamente após o parto e fornecem colostro congelado e selecionado de fêmeas com baixa contagem de células somáticas, poderia incluir em seu critério para seleção do colostro, a idade das vacas, objetivando-se aumento da imunidade passiva destes animais. Como é

sabido, as vacas mais velhas possuem maiores contagens celulares, portanto, o manejo desta fazenda deve ser revisto.

6.4 Citocinas presentes no soro sanguíneo dos bezerros neonatos

Neste trabalho foi possível quantificar a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro sanguíneo dos bezerros neonatos, sendo que a colheita das amostras foi realizada seqüencialmente, acompanhando os animais desde o nascimento, cuja amostra de sangue foi obtida antes da ingestão do colostro (T0), até o décimo quinto dia de vida (T6).

Conforme apresentado no Material e Métodos, a citocina IFN- γ não foi mensurada nas amostras de sangue dos bezerros, em virtude da dificuldade em se adquirir o kit necessário á sua mensuração, na segunda etapa da pesquisa. Porém, em virtude dos resultados obtidos e da possibilidade da presença das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro dos bezerros ser em decorrência da transferência destas pelo colostro bovino, estudos futuros poderão ser realizados para o IFN- γ , a fim de se verificar o comportamento desta citocina na imunidade inata dos bezerros neonatos, assim como quantificar as concentrações que podem ser transferidas pelo colostro bovino.

Poucos foram os trabalhos que quantificaram as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sangue dos bezerros neonatos provenientes do colostro materno (GOTO et al., 1997; YAMANAKA et al., 2003b), sendo os resultados obtidos para as concentrações das citocinas, nestes dois trabalhos, superiores aos obtidos no presente estudo.

Goto et al. (1997) encontraram valores médios de 1.000 pg/mL, no terceiro dia de vida e no sétimo dia as concentrações decaíram para valores inferiores a 700 pg/mL, não sendo mais a IL-1 β detectada no soro dos bezerros a partir do 14° dia.

Yamanaka et al. (2003b) encontraram as maiores concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α em amostras obtidas 24 horas após a ingestão de colostro,

sendo que no 14º estas citocinas não foram detectadas na circulação dos bezerros. Os valores médios obtidos para as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , 24 horas após a ingestão do colostro, foram respectivamente, de 46.900; 1023; 190 e 690 pg/mL.

A diferença na quantidade de citocinas encontradas no soro dos bezerros neonatos, quando comparado aos outros trabalhos, pode-se referir, da mesma forma que para as amostras das fêmeas bovinas, à utilização de kits de ensaio imunossorvente ligado à enzima para humanos.

Analizando-se as concentrações das citocinas presentes na circulação dos neonatos em relação aos tempos de colheitas, verificou-se que o ocorrido no presente trabalho foi semelhante ao encontrado por Goto et al. (1997) e Yamanaka et al. (2003b), sendo que antes da ingestão do colostro e no décimo quinto dia de vida, as citocinas não foram mais detectadas na circulação destes animais.

Esta presença transitória das citocinas, verificada neste estudo e corroborada pelos autores acima citados confirma a hipótese de que, durante o período de imaturidade do sistema imune inato dos bezerros, este é incapaz de secretar citocinas, identificado através da ausência de citocinas na circulação imediatamente após o nascimento e antes da primeira mamada do colostro.

A diminuição gradual da concentração das citocinas na circulação dos bezerros neonatos, a partir do T3, e desaparecendo completamente no T6, elucida que o mecanismo de absorção destas citocinas presentes no colostro pela mucosa intestinal do neonato pode se comportar de forma semelhante ao ocorrido com as imunoglobulinas, através da diminuição de células capazes de expressar os receptores para estas proteínas com o avançar do tempo pós-nascimento (BARRINGTON, PARISH, 2001) Além disso, a secreção das citocinas caracteriza-se por ser um evento breve, não sendo armazenadas como moléculas pré-formadas, e sua síntese é iniciada por novas transcrições gênicas, como resultado da ativação celular. Uma vez sintetizada, as citocinas são rapidamente secretadas (ABBAS, LICHTMAN, 2005) o que poderia justificar a baixa permanência destas citocinas na circulação dos neonatos avaliados neste trabalho.

As citocinas provenientes do colostro materno são absorvidas pela mucosa intestinal do neonato, e já se verificou, através dos resultados obtidos neste trabalho e dos achados da literatura (GOTO et al., 1997; HAGIWARA et al., 2000), que as células do colostro bovino podem sintetizar citocinas, independentemente de estarem ativadas ou não. Este mecanismo pode ser similar ao ocorrido com os outros componentes imunológicos do colostro, uma vez estes, presentes no colostro de primeira ordenha, visam de forma mais significativa a imunidade neonatal do que da própria glândula mamária (PAAPE et al., 2003, GOMES, 2008).

Os fagócitos dos neonatos possuem atividade fagocitária reduzida, com as funções se estabelecendo somente no final da gestação, porém, com o estresse ocorrido no momento do parto, a ação bactericida dessas células torna-se ínfima, comprometendo a resposta imune inata do neonato e conseqüentemente, a secreção de citocinas (BARRINGTON, PARISH, 2001). Diante disso, o neonato bovino depende exclusivamente das citocinas existentes no colostro materno para auxiliar no mecanismo de uma resposta imune mais efetiva.

Os neonatos bovinos apresentam deficiência na resposta Th1, em decorrência dos mediadores presentes na placenta bovina e liberação de estrógeno e cortisol no momento do parto, todos com efeitos imunossupressores (MAYER; MAYER-GUIGNARD, 1998). Com o comprometimento desta resposta, ocorre diminuição da resposta imune mediada por células, onde estão envolvidas as secreções das citocinas IFN- γ e TNF- α . Este tipo de resposta, entretanto, pode ser aprimorado através do oferecimento do colostro ao neonato, uma vez que a presença destas citocinas nesta secreção mamária foi comprovada, mesmo em fêmeas livres de infecção mamária.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir, neste trabalho que:

- (a) as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α estão presentes no soro sanguíneo e colostro de primeira ordenha de fêmeas bovinas, verificando-se diferentes perfis nestas duas regiões, com maior quantidade de IFN- γ no colostro e TNF- α no soro;
- (b) ocorre produção de citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α pelas células mononucleares do colostro “in vitro” de primeira ordenha e sangue das vacas, com tendência ao aumento da produção dessas substâncias com tempos de incubação de 120 minutos na presença da ECET;
- (c) as citocinas do colostro bovino são absorvidas pela mucosa intestinal dos neonatos da espécie bovina;
- (d) as vacas possuem maiores concentrações de citocinas IFN- γ e TNF- α no colostro, quando comparadas com as novilhas;
- (e) não há diferenças entre a concentração das citocinas do colostro obtidas em diferentes quartos mamários.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 580 p.

AZEDO, M.R. Influência do vírus da leucose bovina na resposta na resposta imunitária de animais naturalmente infectados. São Paulo, 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BALLOU, M.A.; COBB, C.J.; HULBERT, L.E.; CARROLL, J.A. Effects of intravenous *Escherichia coli* dose on the pathophysiological response of colostrums-fed Jersey calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, p. 76-83, 2011.

BANNERMAN, D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal Animal Science**, v. 87, p. 10-25, 2009.

BANNERMAN, D.D.; KAUF, A.C.W.; PAAPE, M.J.; SPRINGER, H.R.; GOFF, J.P. Comparison of Holstein and Jersey innate immune responses to *Escherichia coli* intramammary infection. **Journal Dairy Science**, v.91, p. 2225-2235, 2008.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; HARE, W.R.; SOHN, E.J. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. **Journal Dairy Science**, v.86, p. 3128-3137, 2003.

BARRINGTON, G.M.; PARISH, S.M. Bovine Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n.3. p. 463-476, 2001.

BENESI, F.J. Síndrome da asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação clínica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, v. 16, n. 1, p. 38-48, 1993.

BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIJS, A.R.; THORPE, R. **Cytokines**, 1 ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 335-360.

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potencial uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.133-147, 2002.

BREATHNACH, C.C.; STURGIL-WRIGHT, T.; STILNER, J.L.; ADAMS, A.A.; LUNN, D.P.; HOROHOV, D.W. Foals are interferon gamma-deficient at birth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p. 199-209, 2006.

BURTON, A.B.; WAGNER, B.; ERB, H.N.; AINSWORTH, D.M. Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p.122-128, 2009.

CHASE, C.C.L.; HURLEY, D.J.; REBER, A.J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America**, Food Animal Practice, v. 24, p. 87-104, 2008.

CHING NG, W.; WONG, V.; MULLER, B.; RAWLIN, G.; BROWN, L. Prevention and treatment of influenza with hyperimmune bovine colostrums antibody. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. 1-10, 2010.

CHOI, H.S.; KO, Y.G.; LEE, J.S.; KWON, O.Y.; KIM, S.; CHEONG, C.; JANG, K.; KANG, S.A. Neuroprotective effects of consuming bovine colostrums after focal brain ischemia/reperfusion injury in rat model. **Nutritional Research and Practice**, v. 4, n.3, p. 196-202, 2010.

COLOTTA, F.; GHEZZI, P.; MANTOVANI, A. Interleukin 1. In: MIRE-SLUIJS, A.R.; THORPE, R. **Cytokines**, 1 ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 1-18.
CONCHA, C. Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions – a review of the literature. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 38, p. 257-272, 1986.

CORTESE, V.S. Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America**. Food Animal Practice, v. 25, p. 221-227, 2009.

COWAN, S.T. Cowan and Steel's, **Manual for the identification of Medical Bacteria**. 2ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1985.

DELLA LIBERA, A.M.M.P. **Avaliação dos fagócitos no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híbridas criadas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2002. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H-D; STÖBER, M. **Exame Clínico dos Bovinos**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, 419 p.

DOAN, T.; MELVOLD, R.; VISELLI, S.; WALTEBAUGH, C. **Imunologia Ilustrada**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 344 p.

EVANS, P.A.; NEWBY, T.J.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. A study of cells in the mammary secretions of sows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.3, p. 515-527, 1982.

FEITOSA, F.L.F.; BIRGEL, E.H.; MIRANDOLA, R.M.S.; PERRI, S.H.V. Proteinograma sérico de bezerros holandeses do nascimento até um ano de vida. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 105-108, 2001.

GOMES, V. **Componentes imunológicos do colostro bovino: células, teores de imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET)**. São Paulo, 2008. 106 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOMES, V.; MADUREIRA, K.M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; BLAGITZ, M.G.; ALVES, M.; BAPTISTELLA, F.; BENESI, F.J. Dinâmica da celularidade do colostro de vacas da raça Holandesa nos pós-parto imediato. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n.5, p. 1047-1053, 2011.

GOTO, M.; MARUYAMA, M.; KITADATE, K.; KIRISAWA, R.; OBATA, Y.; KOIWA, M.; IWAI, H. Detection of Interleukin-1 β in sera and colostrum of dairy cattle and in sera of neonates. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.6, p. 437-441, 1997.

GRECA, F.H.; ZACARIAS, A.S.F.; GIOVANINI, A.; CAMARGO JUNIOR, C.A.; RUBIN, M.R.; SILVA, R.F.K.C. Interleukin-6 (IL-6) influence on colonic anastomosis healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.22, n.2, p.110-114, 2007.

HAGIWARA, K.; ANDO, M.D.J. Bovine colostrum CD8-positive cells are potent IFN- γ producing cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.124, p.93-98, 2008.

HAGIWARA, K.; KATAOKA, S.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Detection of cytokines in bovine colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, p. 183-190, 2000.

HAGIWARA, K.; YAMANAKA, H.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Oral administration of IL-1 β enhanced the proliferation of lymphocytes and the O₂ production of neutrophil in newborn calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.81, p. 59-69, 2001.

HISAEDA, K., HAGIWARA, K., EGUCHI, J.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α levels in sera and whey of cattle with naturally occurring Coliform Mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.9, p.1009-1011, 2001.

INAGAKI, M.; YAMAMOTO, M.; CAIRANGZHUOMA, X.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H.; KAWASAKI, M.; YAMASHITA, K.; YABE, T.; KANAMURU, Y. In vitro and in vivo evaluation of the efficacy of bovine colostrum against human rotavirus infection. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 680-682, 2010.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Laboratory Methods for use in mastitis work**. Brussels, 1981. 27p. (Bulletin, 132).

KELLY, G.S. Bovine colostrums: a review of clinical uses. **Alternative Medicine Review**, v.8, n.4, p. 378-394, 2003.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. Baltimore. Willians & Wilkians, 1984.

LAWTON, J.W.M.; SHORTRIDGE, K.F.; ROSAMUND, L.C.W.; NG, M.H. Interferon synthesis by human colostrum leucocytes. **Archives of Disease in Childhood**, v.54, p.127-130, 1979.

LE JAN, C. Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. **Veterinary Research**, v. 27, p. 403-417, 1996.

LENNETTE, E.M.; BALOWS, A.; HANSLER Jr., w.j.; SHADOMY, H.J. **Manual of Clinical Microbiology**, 4ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985.

MAYER, E.; MAYER-GUIGNARD, J. Interferon-Gamma. In: MIRE-SLUIS, A.R.; THORPE, R. **Cytokines**, 1 ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 391-400.

MINITAB. **The student edition of MINITAB statistical software adapted for education-1.3** Release. New York: Addison-Wesley, 2000.

MITTERHUEMER, S.; PETZL, W.; KREBS, S.; MEHNE, D.; KLANNER, A.; WOLF, E.; ZERBE, H.; BLUM, H. Escherichia coli infection induces distinct local and systemic transcriptone responses in the mammary gland. **BMC Genomics**, v. 11, n. 138, p. 2-16, 2010.

NICKERSON, S.C.; PANKEY, J.W. Cytologic observations of the bovine teat end. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 8, p. 1433-1441, 1983.

NICKERSON, S.C.; PANKEY, J.W.; BODDIE, N.T. Distribution, location, and ultrastructure of plasma cells in the uninfected, lactating bovine mammary gland. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 209-217, 1984.

OHMANN, H.B.; CAMPOS, M.; SNIDER, M.; RAPIN, N.; BESKORWAYNE, T.; POPOWYCH, Y.; LAWMAN, M.J.P.; ROSSI, A.; BABIUK, L.A. Effect of chronic administration of recombinant bovine tumor necrosis factor to cattle. **Veterinary Pathology**, v. 26, p. 462-472, 1989.

OHTSUKA, H.; TOKITA, M.; TAKAHASHI, K.; MASUI, M.; KOHIRUIMAKI, M.; HAYASHI, T.; ANDO, T.; WATANABE, D.; KAWAMURA, S. Peripheral mononuclear cell response in Japanese black calves after oral administration of IFN- α . **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n.10, p. 1063-1067, 2006.

OKADA, H.; ITO, T.; OHTSUKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H.; YAMASHITA, K.; YOSHINO, T.; ROSOL, T.J. Detection of Interleukin-1 and Interleukin-6 on

cryopreserved bovine mammary epithelial cells *in vitro*. The **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.7, p.503-507, 1997.

OPDEBEECK, J.P. Mammary gland immunity. **The American Veterinary Medical Association**, v.181, n.10, p.1061-1065, 1982.

OTTO, W.; NAJNIGIER, B.; STELMASIAK, T.; ROBINS-BROWNE, R.M. Randomized control trials using a tablet formulation of hyperimmune bovine colostrum to prevent diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in volunteers. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, p. 862-868, 2011.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, n.2, p. 109-121, 2002.

PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D.; ZHAO, X.; LEE, J.W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v.34, p. 597-627, 2003.

PAAPE, M.J.; GUIDRY, A.J.; JAIN, N.C.; MILLER, R.H. Leukocytic defense mechanisms in the udder. **Flem. Vet. J.**, v. 62, suppl. 1, p. 95-109, 1991.

PARK, Y.H.; FOX, L.K.; HAMILTON, M.J. et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 998-1006, 1992.

POLITIS, I.; McBRIDE, B.W.; BURTON, J.H et al. Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p. 858-862, 1991.

QUIGLEY, J.D.; DREWRY, J.J. Symposium: practical considerations of transition cow and calf management. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2779-2790, 1998.

RABOT, A.; WELLNITZ, O.; MEYER, H.H.D.; BRUCKMAIER, R.M. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 93-99, 2007.

RAINARD, P.; PAAPE, M.J. Sensitization of the bovine mammary gland to *Escherichia coli* endotoxin. **Veterinary Research**, n. 28, p. 231-238, 1997.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, p. 369-400, 2006.

RANGEN, S.A.; SURUJBALLI, O.P.; LUTZE-WALLACE, C.; LEES, V.W. Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p. 270-274, 2009.

RAZAVI, S.M.; NAZIFI, S.; VOSOUGHU, F.; MASOUDIAN, M.; NOWROOZI, A.; RAKHSHANDERROO, E. Alterations of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), and sialic acids in malignant ovine theileriosis. **Comp Clin Pathol**, v.19, p.503-509, 2010.

RICHARDS, C.D. Interleukin-6. In: MIRE-SLUIS, A.R.; THORPE, R. **Cytokines**, 1 ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 87-108.

RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F.W. The influence of colostral leukocytes on the immune system of the neonatal calf. I Effects on lymphocyte responses. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.98, p. 77-116, 1991.

RINALDI, M.; LI, R.W.; BANNERMAN, D.D.; DANIELS, K.M.; EVOCK-CLOVER, C.; SILVA, M.V.B.; PAAPE, M.J.; RYSEN, B.V.; BURVENICH, C.; CAPUCO, A.V. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune responses elements define early response to *E.coli* mastitis. **Functional and Integrative Genomics**, v.10, p. 21-38, 2010.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

SAMPAIO, I. B. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998, 221 p.

SANCHES, B.G.S. **Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da**

artrite encefalite caprina, à *Corynebacterium psedotuberculosis*. São Paulo, 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SCHEERLINCK, J.P.Y. Functional and structural comparison of cytokines in different species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 39-44, 1999.

SENOGLES, D.R.; MUSCOPLAT, C.C.; PAUL, P.S. et al. Ontogeny of circulating B lymphocytes in neonatal calves. **Research in Veterinary Science**, v.25, p. 34-36, 1978.

SHIBATA, I.; ONO, M.; MORI, M. Passive protection against porcine epidemic diarrhea (PED) virus in piglets by colostrums from immunized cows. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n.3. p. 655-658, 2011.

SHING, C.; HUNTER, D.C.; STEVENSON, M. Bovine colostrums supplementation and exercise performance: potential mechanisms. **Sports Medicine**, v.39, n.12, p. 1033-1054, 2009.

SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; RAINARD, P.; PAAPE, M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, n.8, p. 3286-3292, 1997.

SORDILLO, L.M.; PEEL, J.E. Effect of Interferon- γ on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2119-2125, 1992.

SORDILLO, L.M.; REDMOND, M.J.; CAMPOS, M.; WARREN, L.; BABIUK, L.A. Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 298-301, 1991.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1851-1865, 1997.

STELWAGEN, K.; CARPENTER, E.; HAIGH, B.; HODGKINSON, A.; WHEELER, T.T. Immune components of bovine colostrums and milk. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 3-9, 2009.

THAPA, B.R. Therapeutic potentials of bovine colostrum. **Indian Journal of Pediatrics**, v.72, p. 849-852, 2005.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 8 ed. São Paulo: Roca, 2008, 532 p.

USTUNDAG, B.; YILMAZ, E.; DOGAN, Y.; AKARSU, S.; CANATAN, H.; HALIFEOGLU, I.; CIKIM, G.; AYGUN, A.D. Levels of cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. **Mediators of inflammation**, v.6, p.331-336, 2005.

WAN, Z.; ZHANG, F.; GENG, Q.; WANG, P.; ZHOU, P.; ZHANG, Y. Effect of orally administered bovine colostrums on cytokine production in vivo and in vitro in immunosuppressed mice. **International Dairy Journal**, v.20, p.522-527, 2010.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 6, p. 461-468, 2003a.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrums-fed newborn calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n.7, p. 813-816, 2003b.

YAMANAKA, H.; KATAGIRI, Y.; DOMI, M.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Effect of Interleukin-1 receptor antagonist on Concanavalin A response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.8, p. 933-935, 2001.

ZANARDO, V.; GOLIN, R.; AMATO, M.; TREVISANUTO, D.; FAVARO, F.; FAGGIAN, D.; PLEBANI, M. Cytokines in human colostrum and neonatal jaundice. **Pediatric Research**, v.62, n.2, p. 191-194, 2007.