ELIZABETH BOHLAND

**Atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos
versus Escherichia coli “in vitro” : influência do volume de colostro
mamado e da idade**

São Paulo

2008

ELIZABETH BOHLAND

**Atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos
versus Escherichia coli “in vitro” : influência do volume de colostro
mamado e da idade**

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 Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Fernando José Benesi

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1969
FMVZ

Bohland, Elizabeth

Atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos *versus Escherichia coli* “in vitro”: influência do volume de colostro mamado e da idade / Elizabeth Bohland. – São Paulo : E. Bohland, 2008.

166 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica 2008.

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Metabolismo oxidativo. 2. Fagocitose. 3. Polimorfonuclear.
4. *Escherichia coli*. 5. Bezerro. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da influência da ingestão e do volume de colostro mamado e do fator etário sobre a atividade de neutrófilos do sangue de bezerros neonatos - metabolismo oxidativo e fagocitose sobre a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET) "in vitro", protocolado sob o nº996/2006, utilizando 15 (quinze) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando José Benesi está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/06".

(We certify that the Research "Evaluation of effects of colostrum ingestion and of age factor on newborn calves blood neutrophils function - oxidative burst and phagocytosis of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) "in vitro", protocol number 996/2006, utilizing 15 (fifteen) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Fernando José Benesi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006).

São Paulo, 18 de outubro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Elizabeth Bohland

Título: Atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos *versus* *Escherichia coli* “in vitro” : influência do volume de colostro mamado e da idade.

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
Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

as minhas filhas Clarice e Beatriz dedico o trabalho do “computador” e do cuidado com os bezerrinhos da mamãe lá na “UP”

aos meus pais - “vovô e vovó” - sem os quais teria sido impossível terminar este trabalho

e ao meu amor Chicão pela sua compreensão, paciência, carinho, apoio, etc...etc...etc...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Professor Dr. Fernando José Benesi, que acreditou que eu concluiria este trabalho e por ter entendido e respeitado o meu tempo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Luiz D'Angelino pela orientação e amizade em todos esses anos de convívio;

Ao Professor Dr. Antonio Fernandes Filho por sua generosidade e amor à Medicina Veterinária;

A Fernanda Cavallini Cyrillo uma grande amiga, pelo incentivo, colaboração e dedicação à este trabalho;

A todos os funcionários da Fazenda Atibainha, principalmente da M.V. Fernanda Brasil pela amizade e enorme dedicação a este trabalho, sem a qual o mesmo não teria sido realizado;

A Vanessa Moura de Sá Rocha, pela amizade, incentivo e paciência;

A Cristina Massoco Salles Gomes pelo estímulo na realização deste trabalho e pelas sábias palavras nos meus momentos de desespero: “é assim mesmo, não é ratinho de laboratório”;

A Acácia Orieth Elias pela amizade, apoio e pelo abstract da tese;

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ – USP pela amizade e incentivo durante todos esses anos;

Ao Fernando Nogueira de Souza pelo cuidado com os bezerros nos finais de semana e feriados;

A Anna Klara Bohland pelas sugestões e pelo auxílio na análise estatística;

Ao Médico Veterinário Fábio Novelli Martorelli pela amizade e auxílio nas contagens diferenciais de leucócitos;

Ao Professor Dr. Luis Carlos de Sá-Rocha do Departamento de Patologia da FMVZ – USP pela amizade e por disponibilizar o uso do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da FMVZ - USP;

A bolsista de Iniciação Científica Fernanda Moda Piva pelo auxílio com os bezerros;

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da FMVZ: Priscila, Ricardo e Magali sempre muito atenciosos;

Aos pós graduandos Isabel, Andréia, Mônica, Denise, Glauciê, Viviane e Karin pela simpatia, ajuda e agradável convívio no laboratório;

Aos pós-graduandos Raquel, Mariana, Flávio, Barreto, Humberto e Fred pela ajuda com os bezerros;

Aos residentes e funcionários do Serviço de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da FMVZ – USP pelo apoio;

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica: Adelaide, Cida, Cláudia, Marly, Clara, Samantha, Maria Helena e Maria Luíza pela ajuda e amizade;

A Stephania Kartuchi por seu auxílio precioso nos finais de semana e pela organização das fichas dos animais;

A todos os funcionários do setor de transporte da FMVZ;

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ – USP, em especial à Elza Faquim, pela seriedade e profissionalismo;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho;

À FAPESP por ter concedido o auxílio a este projeto de pesquisa (05/50548-6)

bactéria
no
meio
é
cultura

arnaldo antunes

RESUMO

Bohland, E. **Atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos versus *Escherichia coli* “in vitro”**: influência do volume de colostro mamado e da idade [Neonatal calves blood polymorphonuclear activities versus *Escherichia coli* “in vitro”: colostrum volume intake and calf age influences]. 2008. 166 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O objetivo foi avaliar a atividade funcional dos polimorfonucleares (PMN) do sangue de bezerros neonatos “in vitro” – metabolismo oxidativo induzida por: *S. aureus*, *E. coli* e PMA e fagocitose para *S. aureus* e *E. coli*, em citômetro de fluxo. Quinze animais avaliados nos tempos: t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.) receberam quatro litros (grupo 1 – G1), dois litros de colostro (grupo 2 – G2) e somente leite (grupo 3 – G3). O metabolismo oxidativo basal não diferiu em nenhum dos grupos e idades. Entre os grupos este foi menor em G1 do que em G3 (t3). Induzido pela *S. aureus* foi maior entre t1 e t3 (grupo 1), entre t2 e t3 (grupo 2) e sem diferenças (grupo 3). Entre os grupos G1 foi maior que G3 (t1). Induzido pela *E.coli* foi maior entre t1 e t3 (grupo 1), maior em t2 (grupo 2) e sem diferenças (grupo 3). Entre os grupos G1 foi maior que G2 e G3 (t1). O PMA estimulou a explosão respiratória em G1, G2 e G3 entre t0 e t5. Entre os grupos G1 foi menor para do que G2 e G3. A comparação entre metabolismo basal e induzido para G1 foi maior para PMA e *S. aureus* entre t0 e t5 e para *E. coli* entre t1 e t5; para G2 foi maior para o PMA entre t0 e t5, para *S. aureus* entre t0 e t3 e para a *E. coli* entre t2 e t4; para G3 foi maior para o PMA e *S.aureus* entre t0 e t5 e para a *E. coli* entre t3 e t5. A fagocitose induzida pela *S. aureus* foi maior nos tempos t1, t2 e t4 (grupo1) e o percentual de fagocitose foi maior após t0; para o grupo 2, foi maior em t2 e t3 e o percentual foi maior após t0; para o grupo 3, não diferiram entre os tempos. Entre os grupos

G1 foi maior que G2 e G3 (t4) e o percentual foi maior para G1 e G2 (t3) do que G3 e maior para G1 do que G2 (t5). A fagocitose induzida pela *E. coli* e o percentual de fagocitose não diferiram em nenhum grupo. Entre os grupos G1 foi maior do que G3 (t0) e o percentual foi maior para G1 do que G2 (t2). Conclusão: o colostro não interferiu no metabolismo oxidativo basal e estimulado pelo PMA, a *S. aureus* estimulou o metabolismo oxidativo e a fagocitose antes e após a ingestão de colostro. A *E. coli* não induziu o metabolismo oxidativo (G3) e não foi eficiente para estimular a fagocitose. Não ficou esclarecida a influência da idade sobre a atividade dos PMNs. O fornecimento de quatro litros de colostro melhora resposta funcional dos PMNs para as bactérias.

Palavras-chave: Metabolismo oxidativo. Fagocitose. Polimorfonuclear. *Escherichia coli*.

Bezerro

ABSTRACT

Bohland, E. Neonatal calves blood polymorphonuclear activities versus *Escherichia coli* “in vitro”: colostrum volume intake and calf age influences. [**Atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos versus *Escherichia coli* “in vitro”**: influência do volume de colostro mamado e da idade]. 2008. 166 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of this study was to evaluate “in vitro” functional activities of neonatal calves blood polymorphonuclear leukocytes (PMNs) – respiratory burst and phagocytosis induced by *S.aureus*, *E.coli* and PMA, measured by flow cytometry. Fifteen calves were tested at times: t0 (before milk/colostrum ingestion); t1 (until 48 hours post partum); t2 (48-96 hrs p.p.); t3 (96 - 144 hrs. p.p.); t4 (144-192 hrs. p.p.); t5 (192-240 hrs. p.p.) and the groups intakes were 4 liters of colostrum (group 1), 2 liters of colostrum (group 2) and only milk (group 3). The basal respiratory burst did not differ among groups but it was lower in G1 than G3 (t3). The burst induced by *S.aureus* was higher between t1 and t3 (G1) and t2 and t3 (G2) and showed no difference (G3). The G1 values were higher than G3 (t1). *E.coli* induced higher values between t1 and t3 (G1), higher on t2 (G2) and showed no difference (G3). Among groups G1 was higher than G2 and G3 (t1). The PMA induced the respiratory burst in G1, G2 and G3 between t0 and t5. Among groups G1 was lower in G2 than G3. The induced basal metabolism was compared and G1 was higher to PMA and *S.aureus* between t0 and t5 and to *E.coli* between t1 and t5. The G2 showed higher values to PMA between t0 and t5, to *S.aureus* between t0 and t3 and *E.coli* between t2 and t4. The G3 showed higher values in PMA and *S.aureus* between t0 and t5 and *E.coli* between t3 and t5. The *S.aureus* induced phagocytosis was higher on t1, t2 and t4 (G1) and the phagocystosis percentage was higher after t0. G2 groups showed higher values on t2 and t3 and higher percentage after t0. G3 had

no difference on times. G1 showed higher values than G2 and G3 (t4) and G1 and G2 (t3) had higher percentage than G3 with G1 higher than G2 (t5). The *E.coli* induced phagocytosis and its percentage did not differ among groups. G1 was higher than G3 (t0) and G1 showed higher phagocytosis percentage than G2 (t2). Conclusion: the colostrum did not affect either, the basal respiratory burst and the one stimulated by PMA. *S. aureus* stimulated the respiratory burst and phagocytosis before and after the colostrum intake. *E.coli* did not induce the respiratory burst (G3) and did not stimulate the phagocytosis. The age influence in PMNs activity was not totally clarified. The intake of 4 litters of colostrum increases the PMNs activity against the species of bacteria studied.

Key words: respiratory burst, phagocytosis, polymorphonuclear, *Escherichia coli*, calves.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exemplo de uma bateria de tubos utilizados para avaliar a atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos "in vitro" - São Paulo – 2008.....	57
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Valores médios da temperatura retal de bezerros neonatos, segundo o volume de colostro ingerido (4,0 litros - G1; 2,0 litros - G2; somente leite - G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	67
Figura 2	Valores médios da frequência de movimentos respiratórios por minuto de bezerros neonatos, segundo o volume de colostro ingerido (4,0 litros - G1; 2,0 litros - G2; somente leite - G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	67
Figura 3	Valores médios dos batimentos cardíacos por minuto de bezerros neonatos, segundo o volume de colostro ingerido (4,0 litros - G1; 2,0 litros - G2; somente leite - G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	68
Figura 4	Produção espontânea de H_2O_2 , medida pela média da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro, segundo a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	72
Figura 5	Metabolismo oxidativo de PMN do sangue, de bezerros que ingeriam 4,0 litros de colostro, incubados com <i>S. aureus</i> marcado com PI e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	72
Figura 6	Valor médio e desvios-padrão da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros do Grupo 1, incubados com DCFH e <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594 e a evolução da idade- São Paulo – 2008.....	73
Figura 7	Produção de H_2O_2 por PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro, estimulada por PMA e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	73
Figura 8	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com <i>S. aureus</i> marcado com PI (DCFH + <i>S. aureus</i>), de animais que ingeriram 4,0 litros de colostro segundo a idade São Paulo – 2008.....	74
Figura 9	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + <i>E. coli</i>), de animais que ingeriram 4,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008.....	74
Figura 10	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com PMA (DCFH + PMA), de animais que ingeriram 4,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008.....	75
Figura 11	Atividade fagocítica, medida pela intensidade de fluorescência, de PMN para <i>S. aureus</i> marcado com PI de bezerros que ingeriram 4,0 litros de colostro e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	77

Figura 12	Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para <i>S. aureus</i> , antes (t0) e após a ingestão de 4,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	78
Figura 13	Fagocitose de leucócitos PMNs para <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594, de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro e a idade - São Paulo – 2008.....	79
Figura 14	Percentual de fagocitose de PMNs do sangue de bezerros neonatos para <i>E. coli</i> , antes (t0) e após a ingestão de 4,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	79
Figura 15	Produção espontânea de H ₂ O ₂ , medida pela média geométrica da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro, segundo a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	83
Figura 16	Metabolismo oxidativo de PMN do sangue, de bezerros que ingeriam 2,0 litros de colostro, incubados com <i>S. aureus</i> marcado com PI e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	83
Figura 17	Valor médio e desvios-padrão da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros que ingeriam 2,0 litros de colostro, incubados com DCFH e <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594 e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	84
Figura 18.	Produção de H ₂ O ₂ por PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro, estimulada por PMA e a evolução da idade São Paulo – 2008.....	84
Figura 19	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com <i>S. aureus</i> marcado com PI (DCFH + <i>S. aureus</i>), de animais que ingeriram 2,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008.....	85
Figura 20	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com <i>E. coli</i> marcado com Alexa Fluor 594 (DCFH + <i>E. coli</i>), de animais que ingeriram 2,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008.....	85
Figura 21	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com PMA (DCFH + PMA), de animais que ingeriram 2,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008	86
Figura 22	Atividade fagocítica, medida pela intensidade de fluorescência para <i>S. aureus</i> marcado com PI, de PMNs de bezerros que ingeriram 2,0 litros de colostro e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	88
Figura 23	Percentual de fagocitose de PMNs do sangue de bezerros neonatos para <i>S. aureus</i> , antes (t0) e após a ingestão de 2,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	89

Figura 24	Fagocitose de leucócitos PMNs para <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594, de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	90
Figura 25	Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para <i>E. coli</i> , antes (t0) e após a ingestão de 2,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	90
Figura 26	Produção espontânea de H ₂ O ₂ , medida pela média geométrica da intensidade de fluorescência de PMNs do sangue de bezerros neonatos que ingeriram somente leite, segundo a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	93
Figura 27	Metabolismo oxidativo de PMNs do sangue, de bezerros que ingeriram somente leite ao nascimento, incubados com <i>S. aureus</i> marcado com PI e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	93
Figura 28	Valor médio e desvios-padrão da intensidade de fluorescência de PMNs do sangue de bezerros do Grupo 3 (que ingeriram somente leite), incubados com DCFH e <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594 e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	94
Figura 29	Produção de H ₂ O ₂ por PMNs do sangue de bezerros neonatos, que ingeriram somente leite ao nascimento, estimulada por PMA e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	94
Figura 30	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com <i>S. aureus</i> marcado com PI (DCFH + <i>S. aureus</i>), de animais que ingeriram somente leite segundo a idade - São Paulo – 2008.....	95
Figura 31	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + <i>E. coli</i>), de animais que ingeriram somente leite segundo a idade - São Paulo – 2008.....	95
Figura 32	Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com PMA (DCFH + PMA), de animais que ingeriram somente leite segundo a idade - São Paulo – 2008.....	96
Figura 33	Atividade fagocítica, medida pela intensidade de fluorescência, de PMN de bezerros para <i>S. aureus</i> marcado com PI que ingeriram leite e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	98
Figura 34	Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para <i>S. aureus</i> , antes (t0) e após a ingestão de leite (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	99
Figura 35	Fagocitose de leucócitos PMN de bezerros neonatos para <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594, que ingeriram leite e a idade - São Paulo – 2008.....	100

Figura 36	Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para <i>E. coli</i> , antes (t0) e após a ingestão de leite (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	100
Figura 37	Metabolismo oxidativo basal de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) e a evolução da idade- São Paulo – 2008.....	103
Figura 38	Metabolismo oxidativo de PMN do sangue s de bezerros neonatos, induzido pela <i>S. aureus</i> , antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) e a evolução da idade- São Paulo – 2008.....	104
Figura 39	Metabolismo oxidativo estimulado pela <i>E. coli</i> de PMN de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) e a evolução da idade- São Paulo – 2008.....	105
Figura 40	Metabolismo oxidativo estimulado com PMA, de PMN do sangue de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) - São Paulo – 2008.....	106
Figura 41	Atividade de fagocitose medida pela média e d.p. da intensidade de fluorescência de PMN de bezerros para <i>S. aureus</i> , segundo o volume de colostro fornecido (quatro litros - Grupo 1, dois litros - Grupo 2) e somente leite (Grupo 3), e a idade - São Paulo, 2008.....	108
Figura 42	Percentual de fagocitose de PMN do sangue para a <i>S. aureus</i> , segundo a quantidade de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo – 2008.....	109
Figura 43	Atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros para <i>E. coli</i> , segundo a idade e a quantidade de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo – 2008.....	110
Figura 44	Percentual de fagocitose de PMN do sangue para a <i>E. coli</i> , segundo a quantidade de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008.....	111
Figura 45	Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado: (quatro litros - grupo1 e dois litros -grupo2) ou somente leite (grupo 3) - São Paulo 2008.....	115
Figura 46	Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado: quatro litros (grupo1) e dois litros (grupo2) e somente leite (grupo 3) - São Paulo – 2008.....	116

Figura 47	Variação dos valores médios de proteína sérica total (g/dl) de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo – 2008.....	123
Figura 48	Variação dos valores médios de albumina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo – 2008.....	124
Figura 49	Variação dos valores médios da fração alfa globulina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo – 2008.....	125
Figura 50	Variação dos valores médios da fração beta globulina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo – 2008.....	126
Figura 51	Variação dos valores médios da fração gama globulina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo – 2008.....	127
Figura 52	Atividade sérica da enzima gama glutamil transferase do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo – 2008.....	128
Figura 53	Valores da mediana da IgM sérica (mg/dl) no sangue de bezerros dos diferentes grupos experimentais, observados antes da mamada do colostro ou leite (t0) e entre 48 e 96 horas p. n. (t2) - São Paulo – 2008.....	129
Figura 54	Variação dos valores da mediana da IgG sérica (mg/dl) no sangue de bezerros dos diferentes grupos experimentais, observados antes da mamada do colostro ou leite (t0) e entre 48 e 96 horas p. n. (t2) - São Paulo – 2008.....	130
Figura 55	Valores da mediana da IgG ₁ sérica (mg/dl) no sangue de bezerros dos diferentes grupos experimentais, observados antes da mamada do colostro ou leite (t0) e entre 48 e 96 horas p. n. (t2) - São Paulo – 2008.....	130
Figura 56	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro. Em destaque a população de polimorfonucleares - São Paulo – 2008.....	163
Figura 57	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro incubados com <i>S. aureus</i> marcado com PI. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo – 2008.....	164
Figura 58	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro incubados com <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo – 2008.....	164

Figura 59	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro incubados com DCFH-DA. Destaca-se a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo – 2008.....	165
Figura 60	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram leite ao nascer incubados com DCFH-DA e <i>S. aureus</i> marcado com PI. Destaca-se a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo – 2008.....	165
Figura 61	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram leite ao nascer incubados com DCFH e <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor 594. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo – 2008.....	166
Figura 62	Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro incubados com DCFH e PMA. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo – 2008.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios e desvios padrão das funções vitais: temperatura, frequência de movimentos respiratórios e frequência de batimentos cardíacos de bezerros neonatos que receberam quatro litros de colostro (grupo1), dois litros de colostro (grupo 2) e leite (grupo3) ao nascimento, segundo a idade- São Paulo –2008.....	66
Tabela 2	Valores das médias e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência obtida na análise do metabolismo oxidativo espontâneo (basal) (DCFH-DA) e estimulado pela Staphylococcus aureus (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (DCFH + S. aureus), Escherichia coli (cepa K12), marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + E. coli) e 12 - Miristato 13-acetato de forbol (PMA) de PMN do sangue de bezerros, "in vitro", que receberam 4,0 litros de colostro ao nascer, segundo a idade- São Paulo – 2008.....	71
Tabela 3	Valores das médias e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", não estimulados (célula) e estimulados pela S.aureus marcada pelo iodeto de propídeo e pela E. coli marcada com Alexa Fluor, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 4,0 litros de colostro - São Paulo – 2008.....	76
Tabela 4	Valores das médias e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela S.aureus marcada pelo iodeto de propídeo e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 4,0 litros de colostro - São Paulo – 2008.....	77
Tabela 5	Valores das médias e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela E. coli marcada por Alexa Fluor 594 e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 4,0 litros de colostro - São Paulo – 2008.....	78
Tabela 6	Valores das médias geométricas e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência obtida na análise do metabolismo oxidativo espontâneo (basal) (DCFH-DA) e estimulado pela Staphylococcus aureus (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (DCFH + S. aureus), Escherichia coli (cepa K12) marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + E. coli) e 12 - Miristato 13-acetato de forbol (PMA) de PMN do sangue de bezerros, "in vitro", que receberam 2,0 litros de colostro ao nascer, segundo a idade - São Paulo, 2008.....	82

Tabela 7	Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da intensidade de fagocitose obtida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", não estimulados (célula) e estimulados pela S.aureus marcada pelo iodeto de propídeo e pela E. coli marcada com Alexa Fluor 594, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 2,0 litros de colostro - São Paulo – 2008.....	87
Tabela 8	Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da intensidade de fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela S.aureus marcada pelo iodeto de propídeo e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 2,0 litros de colostro - São Paulo – 2008.....	88
Tabela 9	Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela E. coli marcada por Alexa Fluor 594 e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 2,0 litros de colostro - São Paulo – 2008.....	89
Tabela 10	Valores das médias geométricas e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência obtida na análise do metabolismo oxidativo espontâneo (basal) (DCFH-DA) e estimulado pela Staphylococcus aureus (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (DCFH + S. aureus), Escherichia coli (cepa K12), marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + E. coli) e 12 - Miristato 13-acetato de forbol (PMA) de PMN do sangue de bezerros, "in vitro", que receberam somente leite ao nascer, segundo a idade - São Paulo 2008.....	92
Tabela 11	Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", não estimulados (célula) e estimulados pela S.aureus marcada pelo iodeto de propídeo e pela E. coli marcada com Alexa Fluor, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam leite - São Paulo – 2008.....	97
Tabela 12	Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela S.aureus marcada pelo iodeto de propídeo e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam leite ao nascer - São Paulo – 2008.....	98
Tabela 13	Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela E. coli marcada por Alexa Fluor 594 e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam leite ao nascer - São Paulo – 2008.....	99
Tabela 14	Metabolismo oxidativo basal de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e de leite (Grupo 3) e a idade - São Paulo – 2008.....	102

Tabela 15	Metabolismo oxidativo de PMN do sangue s de bezerros neonatos, induzido pela S. aureus, antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 litros (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e de leite (Grupo3) e a idade - São Paulo – 2008.....	103
Tabela 16	Metabolismo oxidativo estimulado pela E. coli de PMN de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e de leite (Grupo3), segundo a idade - São Paulo – 2008.....	104
Tabela 17	Metabolismo oxidativo estimulado com PMA, de PMN do sangue de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3), segundo a idade - São Paulo – 2008.....	105
Tabela 18	Valores médios da intensidade de fluorescência de PMNs do sangue de bezerros e a atividade de fagocitose para S. aureus, segundo o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) e a idade - São Paulo – 2008.....	107
Tabela 19	Percentual de fagocitose para a S. aureus de PMN do sangue de bezerros, segundo a idade e o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo – 2008.....	108
Tabela 20	Valores médios da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros e a atividade de fagocitose para E. coli, segundo o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) e a idade - São Paulo – 2008.....	109
Tabela 21	Percentual de fagocitose para a E. coli de PMN do sangue de bezerros, segundo a idade e o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo – 2008.....	110
Tabela 22	Valores médios absolutos e desvios-padrão dos componentes do leucograma de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado (quatro litros - grupo1, dois litros - grupo2), e somente leite (grupo 3) - São Paulo – 2008.....	113
Tabela 23	Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos totais do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado; quatro litros (grupo1) e dois litros (grupo2) ou leite (grupo 3) - São Paulo – 2008.....	114
Tabela 24	Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e a quantidade de colostro mamado: quatro litros (grupo1) e dois litros (grupo2) ou somente leite (grupo3) - São Paulo – 2008.....	116

Tabela 25	Valores médios e respectivos desvios-padrão dos valores séricos de proteína total (g/dl), albumina (g/dl) e frações alfa, beta e gamaglobulinas (g/dl) e da atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase, segundo a idade, de animais que receberam 4,0 litros de colostro ao nascer (grupo 1) - São Paulo – 2008.....	120
Tabela 26	Valores médios e respectivos desvios-padrão dos valores séricos de proteína total (g/dl), albumina (g/dl) e frações alfa, beta e gamaglobulinas (g/dl) e atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase, segundo a idade, de animais que receberam 2,0 litros de colostro ao nascer (grupo 2) - São Paulo – 2008.....	121
Tabela 27	Valores médios e respectivos desvios-padrão dos valores séricos de proteína total (g/dl), albumina (g/dl) e frações alfa, beta e gamaglobulinas (g/dl) e atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase, segundo a idade, de animais que receberam somente leite ao nascer (grupo 3) - São Paulo – 2008.....	122
Tabela 28	Valores médios e respectivos desvios-padrão de proteína total, observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro e , Grupo 3: leite) - São Paulo – 2008.....	123
Tabela 29	Valores médios e respectivos desvios-padrão de albumina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade os grupos experimentais (Grupo 1: 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo – 2008.....	124
Tabela 30	Valores médios e respectivos desvios-padrão da fração alfa globulina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro e , Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008.....	125
Tabela 31	Valores médios e respectivos desvios-padrão da fração beta globulina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo – 2008.....	126
Tabela 32	Valores médios e respectivos desvios-padrão da fração gamma globulina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo – 2008.....	127
Tabela 33	Valores médios e respectivos desvios-padrão da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (UI/l), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo – 2008.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl	microlitro
ACD	ácido citrato dextrose
bpm	batimentos por minuto
C3	terceiro componente do complemento
C3b	Maior fragmento formado pela clivagem do complemento C3 pela C3 convertase
d.p.	desvio-padrão
DCF	2'7' diclorofluoresceína
DCFH	2'7' diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato 2'7' diclorodihidrofluoresceína
dl	decilitro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ECNT	<i>Escherichia coli</i> necrotóxica
ECVT	<i>Escherichia coli</i> verocitotóxica
EDTA	ácido etileno tetra-acético diamina
ERN	espécie reativa de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FcR γ	receptor γ de fragmento cristalizável
CD- 16	também chamado de receptor Fc γ RIII, receptor de baixa afinidade de IgG
Fe $_2^+$	íon ferro 2
FL1	fluorescência 1
FL2	fluorescência 2

fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSC	<i>forward scatter characteristic</i>
g	gramas
G	aceleração da gravidade
G1	grupo 1
G2	grupo 2
G3	grupo 3
GGT	gama glutamil transferase
GO ₂	oxigênio singlete
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HMPS	<i>shunt</i> de hexose monofosfato
hs	horas
Ig	imunoglobulina
IgA	imunoglobulina da classe A
IgG	imunoglobulina da classe G
IgG1	imunoglobulina da classe G sub-classe 1
IgG2	imunoglobulina da classe G sub-classe 2
IgM	imunoglobulina da classe M
IM	intra muscular
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LPS	lipopolissacarídeos
LT	enterotoxinas termolábeis
LT-I	enterotoxinas termolábeis I

LT-II	enterotoxinas termolábeis II
min.	minuto
ml	mililitro
mM	mili Mol
mm	milímetro
mpm	movimentos por minuto
MPO	mieloperoxidase
NaCl	cloreto de sódio
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	nitroblue tetrazolium
ng	nanograma
O_2^-	ânion superóxido
O^2	oxigênio
$^{\cdot}OH$	radical hidroxil
p.n.	pós-nascimento
P.T.	proteína total
P.V.	peso vivo
PBS	Solução Tampão Salina de Fosfato
PI 3 quinase	fosfatidilinositol 3–quinase
PI	iodeto de propideo
PKC	proteína quinase C
PKT	ensina tirosina quinase
PMA	12-miristato 13-acetato de forbol
PMN	Polimorfonuclear

q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SOD	superóxido dismutase
SSC	<i>side scatter characteristic</i>
ST	enterotoxinas termoeestáveis
STa	enterotoxinas termoeestáveis a
STb	enterotoxinas termoeestáveis b
t0	antes da ingestão de colostro/leite
t1	até 48 horas pós nascimento
t2	de 48 a 96 horas pós nascimento
t3	de 96 a 144 horas pós nascimento
t4	de 144 a 192 horas pós nascimento
t5	de 192 a 240 horas pós nascimento
UI	Unidade International
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

% porcentagem

°C graus Celsius

γ gama

μ micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	32
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1	O sistema imune no neonato bovino - o papel do colostro e a imunidade....	33
2.2	Papel do neutrófilo na resposta imune com ênfase no bezerro neonato.....	36
2.3	A diarreia por E.coli nos bezerros.....	43
2.4	Uso da técnica de citometria de fluxo na avaliação da função de neutrófilos do sangue.....	44
3	OBJETIVO GERAL.....	48
3.1	Objetivos específicos.....	48
4	MATERIAL E MÉTODO.....	49
4.1	Animais.....	49
4.2	Alimentação e manutenção.....	49
4.3	Exame Físico.....	50
4.4	Avaliação da influência do colostro e da idade.....	50
4.4.1	Avaliação da influência do colostro	50
4.4.2	Avaliação da influência do fator etário	51
4.5	Colheita das amostras.....	52
4.6	Reagentes.....	52
4.7	Avaliação do metabolismo oxidativo.....	55
4.7.1	Estímulo com <i>S.aureus</i> marcada com PI.....	55
4.7.2	Estímulo com <i>E. coli</i> marcada com Alexa Flúor.....	55
4.7.3	Estímulo com PMA.....	55
4.8	Análise da fagocitose por citometria de fluxo.....	56
4.8.1	Fagocitose estimulada por <i>S.aureus</i> marcada com PI.....	56
4.8.2	Atividade fagocítica utilizando a <i>E. coli</i> marcada com Alexa Fluor.....	56
4.9	Mensuração do metabolismo oxidativo e da fagocitose.....	58
4.10	Leitura das amostras no Citômetro de Fluxo.....	58
4.11	Exames Complementares.....	60
4.11.1	Leucograma.....	60

4.11.2	Proteinograma e avaliação da atividade sérica da Gamaglutamiltransferase.....	61
4. 11.3	Determinação das imunoglobulinas IgM, IgG e IgG ₁	62
4.12	Análise Estatística.....	62
5.	RESULTADOS.....	64
5.1	Atividade funcional de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro”..	68
5.1.1	Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 1.....	69
5.1.1.1	Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro".....	69
5.1.1.2	Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro".....	75
5.1.2	Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 2.....	80
5.1.2.1	Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"	80
5.1.2.2	Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro".....	86
5.1.3	Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 3.....	91
5.1.3.1	Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro".....	91
5.1.3.2	Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"	96
5.2	Avaliação comparativa da atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos amamentados com quatro (G1) e dois litros de colostro (G2) e quatro litros de leite (G3)	101
5.2.1	Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro" – Comparação entre os grupos G1 e G2 e G3.....	101
5.2.2	Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro" - Estudo comparativo entre os grupos G1 e G2 e G3...	106
5.3	Exames complementares.....	112
5.3.1	Leucograma.....	112
5.3.1.1	Avaliação do número total de leucócitos do sangue de bezerros neonatos.....	114
5.3.1.2	Avaliação do número de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos..	115
5.3.2	Proteinograma e atividade sérica da Gamaglutamiltransferase.....	117
5.3.3	Determinação das imunoglobulinas M, G e G ₁ (IgM, IgG e IgG ₁).....	129

6	DISCUSSÃO.....	131
6.1	Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 1....	133
6.2	Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 2....	139
6.3	Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 3....	142
6.4	Avaliação comparativa da atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos amamentados com quatro litros (G1) e dois litros de colostro (G2) e quatro litros de leite (G3).....	145
6.5	Exames Complementares.....	149
7	CONCLUSÃO.....	152
	REFERÊNCIAS.....	154
	ANEXO.....	163

1 INTRODUÇÃO

Os bezerros neonatos são particularmente susceptíveis às doenças infecciosas causadas por microorganismos que raramente são patogênicos para os animais adultos (LAMOTTE; EBERHART, 1976). No nascimento, o sistema imunológico destes animais está suficientemente desenvolvido, entretanto, é incapaz de responder rapidamente e com eficiência às agressões do meio ambiente (TIZARD, 2002). As taxas de mortalidade em bezerros no Brasil são bastante elevadas, sendo principalmente causadas pela diarreia e pneumonia (BENESI, 1996; FEITOSA, 1998). A ausência da imunidade específica ao nascimento e a importância da transferência da imunidade passiva através do colostro já foram bem estabelecidas por vários autores (BENESI, 1992; FEITOSA, 1998; BORGES et al., 2001). Todavia, a função de neutrófilos do neonato bovino frente aos agentes infecciosos, em especial, dirigidos à *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET), e os mecanismos de opsonização por anticorpos e componentes do complemento, ainda não se encontram completamente elucidados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão abordados os assuntos referentes ao sistema imune no neonato bovino: papel do colostro e imunidade; o papel do neutrófilo na resposta imune de bezerro neonato; a diarreia dos bezerros por *Escherichia coli* (*E. coli*) e o uso da citometria de fluxo para a avaliação funcional dos fagócitos polimorfonucleares do sangue.

2.1 O sistema imune no neonato bovino - o papel do colostro e a imunidade

As doenças infecciosas determinam taxas expressivas de morbidade e mortalidade nos bezerros. O aumento da susceptibilidade às infecções pode decorrer de hipogamaglobulinemia, da resposta imune celular deficitária, desordens metabólicas e deficiência das células fagocitárias (RENSHAW et al., 1976).

O sistema imune de várias espécies de mamíferos começa seu desenvolvimento no início da gestação materna. Com o desenvolvimento fetal, este passa por várias mudanças, de acordo com a maturação e especialização de suas células. De maneira geral, quanto mais curto o período de gestação, menos desenvolvido é o sistema imune do neonato. Entretanto, o feto é imunocompetente para várias enfermidades, ainda no útero materno (CORTESE, 2004).

A via por onde anticorpos maternos alcançam o feto é determinada pela estrutura da placenta. A placenta dos ruminantes é do tipo sindesmocorial; ou seja, o epitélio coriônico fica em contato direto com os tecidos uterinos. Este tipo de placenta impossibilita totalmente a passagem transplacentária das moléculas de imunoglobulinas (Ig), e os recém-nascidos dessa espécie são, desta forma, dependentes dos anticorpos recebidos através do colostro (TIZARD, 2002).

As proteínas do colostro são absorvidas intactas, conseguindo passar sem alterações estruturais do colostro para a corrente circulatória das crias durante as primeiras horas de vida. Se o colostro, em função do tempo, perde sua capacidade imunizante, o bezerro também, em horas após o pós-parto, perde rapidamente a capacidade de absorver imunoglobulinas por meio de seu epitélio intestinal. A absorção inicial de IgG do colostro é necessária para a proteção de um animal jovem contra uma doença septicêmica (STOTT, 1979; LUCCI, 1989;).

As IgG passam do plasma materno para a glândula mamária em ruminantes, sem serem transformadas, por meio de um mecanismo seletivo, auxiliado pela presença de sítios receptores nas membranas basais ou intercelulares das células epiteliais glandulares. O número desses sítios, principalmente para IgG1, tende a aumentar com a proximidade ao parto e a transferência das imunoglobulinas se dá por um fenômeno progressivo que tem início três semanas antes do parto, atingindo seu máximo a três dias do mesmo. Dessa forma, a concentração sérica de IgG1 no período que antecede ao parto diminui e a sua concentração na secreção mamária encontra-se em torno de 11 vezes mais elevada que a de IgG2. As concentrações de IgM e IgA no colostro antes ou após ou imediatamente após o parto são multiplicadas por cinco a sete vezes em relação àquelas do soro sanguíneo, portanto, o epitélio mamário desempenha um grande papel neste processo de captação (DOS SANTOS, 2004)

As imunoglobulinas presentes no colostro são a IgG, sendo que a IgG1 constitui 70 a 80% das imunoglobulinas totais, a IgM (10-15%) e a IgA (10-15%). Cada uma delas apresenta funções distintas: a IgG de identificar e destruir possíveis patógenos, a IgM de funcionar como primeira defesa nos casos septicêmicos e a IgA de proteção de mucosas, prevenindo a adesão dos patógenos, por exemplo, a mucosa da parede intestinal. O efeito

dessa última perdura pelo tempo de ingestão de colostro pelo animal (PERES, 2000; TIZARD, 2002).

Dessa forma, a imunidade passiva em neonatos ocorre pela ingestão e subsequente absorção de Ig, imediatamente após o nascimento (BUSH; SATLEY, 1980). A baixa concentração sérica dessas Igs nos bezerros está diretamente associada às taxas de mortalidade e morbidade (BESSER; GAY, 1994) assim como o atraso no desenvolvimento dos indivíduos (WITTUM; PERINO, 1995). O aumento do intervalo entre o nascimento e o consumo de colostro acarreta uma redução na habilidade da absorção de Ig colostrais pelo bezerro (STOTT et al., 1979). Da mesma forma as concentrações de Ig colostrais apresentam uma relação linear positiva com a quantidade de Ig absorvidas pelos bezerros após o consumo de colostro (STOOT; FELLAH, 1983).

Muitos fatores podem influenciar a absorção de colostro, portanto influenciam a imunidade passiva e possivelmente podem aumentar o risco de doenças. Estes fatores incluem sexo do bezerro, raça, o momento da ingestão do primeiro colostro, modo de administração do colostro, quantidade de colostro ingerida e o metabolismo do bezerro (QUIGLEY; DREWRY, 1998)

Estudos realizados nos EUA por Quigley et al. (1994), relataram uma mortalidade em bezerros de raças leiteiras de até 8,4%, sendo que 52% destas fatalidades estavam associadas a casos de diarreia. As diarreias ocorridas em bezerros jovens são devidas principalmente a falhas na ingestão e manejo colostrais (PERES, 2000). Todavia, a função de neutrófilos do neonato bovino frente aos agentes infecciosos, em especial, dirigidos à *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET), e os mecanismos de opsonização por anticorpos e componentes do complemento, ainda não se encontram completamente elucidados.

As taxas de mortalidade em bezerros no Brasil são bastante elevadas, sendo principalmente causadas pela diarreia e pneumonia (BENESI, 1996; FEITOSA, 1998). A

ausência da imunidade específica ao nascimento e a importância da transferência da imunidade passiva através do colostro já foram bem estabelecidas por vários autores (BENESI, 1992; FEITOSA, 1998; BORGES et al., 2001).

O colostro de vaca contém de três a quatro vezes mais células somáticas (leucócitos polimorfonucleares) e uma atividade antibacteriana superior à do leite. É possível a detecção de certas proteínas como, lisozima, componentes do complemento, lactoferrina, fosfatase alcalina, gamaglutamil-transferase e a presença de um fator antitripsínico. A lactoferrina, por exemplo, tem uma elevada afinidade pelo ferro e deste modo, juntamente com o sistema lactoperoxidase do colostro, contribuem acentuadamente como preventivo nas infecções orais e digesto-intestinais dos bezerros. Os componentes do complemento (C1, C2, C3 e C4) agem em sinergia com os anticorpos para a destruição das bactérias. Os leucócitos polimorfonucleares e, em particular os neutrófilos, transportam e sintetizam cerca de 30 enzimas diferentes. Estas enzimas são potencialmente capazes de quebrar praticamente todas as ligações químicas conhecidas na natureza. Um dos constituintes do colostro que tem um papel importantíssimo para os recém-nascidos é o fator antitripsínico presente no colostro da vaca. A cinética da secreção do fator inibidor da tripsina do colostro bovino, durante as oito primeiras ordenhas pós-parto, foi similar às concentrações de imunoglobulinas colostrais observadas nesta mesma cinética (CORTESE, 2004)

2.2 Papel do neutrófilo na resposta imune com ênfase no bezerro neonato

Estudos indicam que outras substâncias presentes no colostro, afora as imunoglobulinas, podem ser benéficas ao bezerro, como o mecanismo que envolve a função neutrofílica (MIGLIORE-SAMOUR, 1992).

O sistema mielóide consiste em células fagocíticas que agem rapidamente, mas são incapazes de um esforço prolongado, essas células derivam da medula óssea, apresentando citoplasma preenchido com grânulos, núcleos lobulados e irregulares, chamadas de polimorfonucleares.

O granulócito neutrófilo polimorfonuclear (neutrófilo) é o principal tipo celular do sistema mielóide, formados na medula óssea, migram para a corrente sanguínea e posteriormente para o interior dos tecidos. Na circulação, há dois conjuntos de neutrófilos, o circulante e o marginal, constituído de células sequestradas na microvasculatura. Durante infecções bacterianas pode haver aumento em cerca de dez vezes no número de neutrófilos circulantes à medida que forem liberados da medula óssea (TIZARD, 2002). Abundantes na circulação, mas não presentes em tecidos saudáveis, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas em grande número para o local da infecção. Seu tempo de vida médio é pequeno, de poucos dias. Estas células constituem cerca de 60 a 75% dos leucócitos sanguíneos nos carnívoros e, de 20 a 35%, nos ruminantes (ALBERTS et al., 2002; TIZARD, 2002)

As funções dos neutrófilos no sistema imune celular são a captura e a destruição do material estranho, utilizando-se da fagocitose. Essa função é dividida em quatro estágios: a quimiotaxia, que é a migração direcionada para dentro dos tecidos; a aderência e opsonização, uma vez que o neutrófilo encontre uma partícula estranha deve-se ligar a ela para realizar a fagocitose, porém isso só ocorre após a neutralização da carga negativa presente na partícula estranha através de um revestimento de anticorpos ou proteína C3b; a ingestão, uma vez ligada à superfície neutrofílica, a partícula é empurrada para o interior da célula onde o fagossomo a engloba e; destruição, que ocorre por meio de dois mecanismos distintos, a explosão respiratória e a digestão por enzimas lisossomais. (TIZARD, 2002).

Os neutrófilos, quando estimulados a realizarem sua atividade bactericida, manifestam um aumento do consumo de oxigênio denominado de “explosão respiratória” que origina uma

enorme quantidade de superóxido e peróxidos de hidrogênio, dos quais derivam metabólitos oxidantes. Essa explosão respiratória é iniciada pela ativação da enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), e nos neutrófilos não estimulados, essa enzima encontra-se em repouso. A enzima NADP oxidase, que depois de ativada, localiza-se na membrana plasmática, incorporando-se dentro do vacúolo fagocítico, catalisando a redução do oxigênio molecular (O_2) em ânion superóxido, o qual é fundamental para atividade bactericida neutrofílica (PARK; GOOD, 1970; MAUGH, 1973). O superóxido formado sofre a dismutação pela ação da superóxido dismutase e origina o peróxido de hidrogênio (BAEHNER et al., 1976). Neste processo existe um consumo transitório de oxigênio em quase 100 vezes (JANEWAY et al., 2004) e envolve a ação da proteína quinase C (PKC) que necessita da ativação da enzima tirosina quinase (PKT), cuja expressão está restrita aos fagócitos (HODGSON et al., 2006).

Esse sistema oxidativo produz, primariamente, oxigênio reduzido em elétron, ou seja O_2^- , que em sua maioria, é convertido pela ação da superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1984). A conversão de H_2O_2 em $^{\cdot}OH$ é por via não enzimática, reação esta catalizada pelo Fe_2^{+} . Dentro do fagolisossomo, a enzima mieloperoxidase (MPO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formam um complexo que reage com íons cloreto, produzindo grande quantidade de agentes tóxicos antimicrobianos como o ácido hipocloroso e as cloramidas (SHEPHERD, 1986).

Embora os fagócitos utilizem o potencial oxidante dos radicais oxidativos na remoção dos patógenos, altos níveis de EROs e ERNs, levam ao estresse oxidativo, onde lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem sofrer oxidação, e assim a efeitos deletérios no organismo pelo comprometimento das funções celulares (YU, 1994).

Nos primeiros dez dias de vida, os bezerros possuem um número total de neutrófilos maior do que os adultos, mas o seu funcionamento não é completo até os 150 dias de idade.

Isto não quer dizer que os bezerros não possam responder aos antígenos, porém a resposta será fraca, lenta e facilmente revertida, originando a moderação da doença, mas não prevenindo, no entanto, a ocorrência da infecção (HAUSER et al., 1986).

Diversos estudos do leucograma têm demonstrado diferenças qualitativas e quantitativas das células leucocitárias de bezerros neonatos quando comparados com animais adultos. Benesi (1992) e Teixeira (1999), estudando bezerros da raça holandesa durante os primeiros dias ou mês de vida, demonstraram que existem variações nos números de neutrófilos e linfócitos principalmente nos primeiros dias de vida.

Existem alguns trabalhos que demonstram diferenças na função de neutrófilos em decorrência da idade (HAUSER, et al., 1986). Pesquisadores como Woldehiwet e Rowan (1990), verificaram que os leucócitos polimorfonucleares, de bezerros de um dia de idade, eram mais eficientes na fagocitose de *S.aureus* do que as mesmas células de animais com idade entre 14 e 84 dias de vida.

A capacidade funcional dos neutrófilos presentes na secreção mamária ainda é incerta. Sabe-se, contudo, que as funções de fagocitose, de motilidade e de explosão respiratória desempenhadas por estas células na secreção mamária, são menos eficientes quando comparadas com as atividades neutrofílicas no sangue periférico (OZKARAGOZ et al., 1988).

A lactoferrina apresenta propriedades bactericidas, aparentemente pelo seqüestro de ferro, e dessa forma impedindo o acesso bacteriano a esse íon (ELASS-ROCHARD et al., 1998; LEE et al., 1998,). Essa proteína é encontrada na secreção mamária, lacrimal, no plasma e nos fluidos sinoviais e estocada nos grânulos dos neutrófilos. A liberação desta lactoferrina dos grânulos neutrofílicos é realizada durante o processo de degranulação (GAHR, 1991). A lactoferrina aumenta a quimiotaxia, superóxido e hidrólise de radicais nos neutrófilos, com tais funções reduzidas à metade na ausência da proteína (WONG et al.,

1997). O efeito da lactoferrina no superóxido é causado por alteração na transdução do sinal do neutrófilo (GAHR, 1991).

Lakritz et al. (2000), sugerem que a redução da absorção de lactoferrina em bezerros alimentados com colostro pasteurizado congelado pode levar a uma redução de superóxido neutrofílico pela alteração do sinal de transdução do neutrófilo ou por uma outra via, ainda desconhecida.

O efeito da ingestão de colostro sobre a função de neutrófilos do sangue e a capacidade bactericida contra *E. coli* foi estudado por alguns autores. Renshaw et al. (1976) observaram que os neutrófilos de bezerros recém nascidos, antes de mamarem o colostro, apresentaram efeito bactericida somente quando a bactéria foi opsonizada com soro de vacas adultas. LaMotte e Eberhart (1976) verificaram uma maior atividade fagocítica de neutrófilos para *E. coli* em bezerros que ingeriram o colostro. Lombardo et al. (1979) demonstraram que o consumo de oxigênio por neutrófilos foi maior quando a *E. coli* era opsonizada com soro de bezerros que mamaram o colostro ou com soro de animais adultos, do que quando a bactéria era opsonizada com soro de bezerros recém-nascidos privados de colostro.

Outro aspecto que deve ser destacado é a menor capacidade do recém nascido responder às infecções mais comuns no período neonatal é o tipo de parto, pois o parto distócico com auxílio obstétrico pode ser direta ou indiretamente determinante de enfermidades do recém-nascido. Um exemplo deste fato é a asfixia neonatal que tem como conseqüências a ingestão de menor quantidade de colostro ou sua ingestão tardia, o que determinará uma menor proteção contra as infecções mais comuns no período neonatal (BENESI, 1993).

Estudos em seres humanos demonstraram que a atividade bactericida de neutrófilos para *E. coli* enteropatogênica é maior quando a suspensão de bactérias é previamente opsonizada com “pool” de soro de adultos normais (HONORIO, 1995). Essa pesquisadora

também observou que a atividade bactericida de fagócitos mononucleares do sangue foi dependente da presença de IgG e do componente C3 do sistema complemento, e de interações entre essas proteínas e componentes do soro humano.

Smits et al. (1997) analisando simultaneamente o metabolismo oxidativo e a atividade de fagocitose de leucócitos polimorfonucleares contra *S. aureus* marcado com iodeto de propideo (PI), do sangue de vacas leiteiras entre a segunda e sexta lactação, verificaram um aumento da fagocitose e do metabolismo oxidativo dos polimorfonucleares concomitantemente ao aumento do tempo de incubação e da concentração de bactérias.

Menge et al., (1998), trabalhando com amostras de sangue de bezerros colhidas uma hora após o nascimento, antes da ingestão de colostro, e amostras de animais, previamente alimentados com colostro, com idade entre três e seis semanas, mensuraram a atividade de fagocitose de polimorfonucleares do sangue contra *E. coli*, utilizando concentrações de bactérias por polimorfonucleares na razão de 6:1 e 60:1. O percentual de polimorfonucleares do sangue em fagocitose e o número de bactérias ingeridas por células foi menor para os bezerros recém nascidos quando o tempo de incubação das amostras foi de dois minutos. Entretanto, quando foram adicionadas concentrações de bactérias por polimorfonucleares na razão de 60:1, incubadas por 15 minutos, o percentual de fagocitose foi idêntico entre os grupos estudados. A comparação entre amostras de bezerros que não ingeriram colostro com amostras de animais que ingeriram o colostro entre uma e quatro horas após o nascimento demonstrou, neste mesmo estudo, uma forte correlação entre a ingestão de colostro e a atividade de fagocitose dos leucócitos polimorfonucleares do sangue.

O metabolismo oxidativo neutrofílico e a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também podem ser estimados por citometria de fluxo utilizando como reagente o 2',7' diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA) que é oxidado pelo peróxido de hidrogênio a 2' 7' diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescência verde. A fluorescência verde produzida é

proporcional à produção de H_2O_2 (PARASKEVAS, 1999). O DCFH-DA e outros reagentes já foram utilizados na avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos do sangue de bovinos (SMITS et al., 1997). A estimulação de neutrófilos com miristato-acetato de forbol (PMA) aumenta em 20 vezes a produção de DCF. O aumento da produção de DCF também ocorre quando os neutrófilos são estimulados com *S. aureus* opsonizado ou IgG ligada a partículas de látex (PARASKEVAS, 1999). Em bovinos, Salgar et al. (1991) também observaram estes efeitos do PMA sobre o metabolismo oxidativo.

Menge et al. (1998) verificaram que o metabolismo oxidativo de polimorfonucleares do sangue periférico de bezerros, independente do estimulante utilizado, foi maior nas amostras de sangue colhidas, uma hora após o nascimento, antes da ingestão de colostro do que as amostras de sangue de bezerros que haviam mamado o colostro com idade entre 3 e 9 semanas.

A utilização do iodeto de propídeo (PI) como marcador da bactéria estudada, permite a avaliação simultânea da fagocitose e do metabolismo oxidativo, dado que a bactéria marcada deste modo emite fluorescência vermelha (SMITS et al., 1997; MASSOCO-SALLES GOMES, 2003).

Kampen et al. (2004) compararam cinco métodos de análise da fagocitose e do metabolismo oxidativo de neutrófilos do sangue de bovinos e verificaram que os métodos de citometria de fluxo, por serem de fácil execução, por evitarem a separação de células e por requererem pequenas amostras de sangue, representam uma alternativa conveniente aos métodos clássicos de análise desses parâmetros.

2.3 A diarreia por *E.coli* nos bezerros

A colibacilose, causada pela *Escherichia coli*, ocorre em todas as espécies animais de produção, nos recém-nascidos, sendo a causa principal de perda econômica nessa faixa etária. A *E.coli* é a principal causa de diarreia em bezerros, leitões e cordeiros, contudo, a diarreia em bezerros recém-nascidos pode ser causada por vários enteropatógenos, influenciados por diversos fatores de risco, tais como imunidade colostrar do bezerro, superlotação, parto da fêmea, condições climáticas e manejo da propriedade. Assim, o termo diarreia indiferenciada aguda de bezerros recém-nascidos é usado para descrever a diarreia aguda, a qual ocorre em bezerros com idade inferior a 30 dias, caracterizada clinicamente por diarreia aquosa profusa aguda, desidratação e acidose progressivas assim como óbito em poucos dias ou logo após a fase inicial, na ausência de intervenção. Com base nos achados clínicos isolados, não costuma ser possível diferenciar entre as causas conhecidas comuns de diarreia nos bezerros recém-nascidos, tais como a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* verocitotóxica (ECVT), *E.coli* necrotóxica (ECNT), rotavírus, coronavírus, *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp (RADOSTITIS et al., 2002).

A distribuição e a ocorrência de enteropatógenos nas fezes de bezerros diarreicos e saudáveis variam de acordo com a localização geográfica, tipo de manejo, idade e raça do bezerro. De forma geral o rotavírus, o *Cryptosporidium* spp, o coronavírus e a *E.coli* enterotoxigênica são, coletivamente e mundialmente, responsáveis por 75-95% das infecções nos bezerros neonatos. A frequência da distribuição dos patógenos pode ser eletiva à idade do animal, onde a *E.coli* enterotoxigênica apresenta maior ocorrência nos animais de até três dias de idade (RADOSTITIS et al., 2002).

A patogenicidade das amostras ETEC é devida à produção de fatores de colonização e de enterotoxinas, sendo relatados dois tipos básicos de enterotoxinas, a saber: as

termoestáveis (ST) e as termolábeis (LT). Entre as primeiras, conhecem-se dois subtipos clássicos STa e STb, sendo que somente a primeira tem sido encontrada em amostras de ETEC de origem bovina (BLANCO et al., 1993). Entre as enterotoxinas termolábeis, são descritos 2 subtipos LT-I e LT-II. (HOLMES et al., 1986; BLANCO et al., 1993) As amostras de ETEC de origem bovina não produzem LT-I (BLANCO et al., 1997), existindo apenas a descrição de amostras produtoras de LT-II (SERIWATANA et al., 1988).

2.4 Uso da técnica de citometria de fluxo na avaliação da função de neutrófilos do sangue

A atividade fagocítica dos neutrófilos pode ser mensurada através de vários métodos que envolvem: a observação microscópica de partículas ingeridas ou a ingestão de *S. aureus* marcado com substâncias radioativas e a contagem de colônias para quantificar as bactérias removidas do sobrenadante ou liberadas dos neutrófilos lisados após a ingestão da bactéria viva (ANDREASEN; ROTH, 2000). Contudo, estes métodos podem gerar falhas e consumir muito tempo. As técnicas que avaliam a fagocitose por meio da citometria de fluxo trouxeram muitas vantagens, pois é possível, através delas, discriminar com maior velocidade as populações celulares, necessitando uma menor quantidade de células para os estudos.

Os métodos de citometria têm sido amplamente utilizados para mensurar a atividade fagocítica de neutrófilos em eqüinos (MASSOCO, PALERMO NETO, 2003), bovinos (SMITS et al., 1997; MENGE et al., 1998; KAMPEN et al., 2004), entre outras espécies estudadas. Nestes métodos as partículas ou microorganismos são marcados com diferentes fluorocromos e a internalização da partícula ou bactéria fagocitada é mensurada.

A citometria de fluxo é um recurso emergente na Medicina Veterinária. O citômetro de fluxo é utilizado para a avaliação da emissão de fluorescência (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*) e permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão. As células da amostra em suspensão podem ser marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (FALDYNA et al., 2001; ROITT et al., 1999). Sua aplicação na hematologia é ampla, incluindo a identificação de células-tronco hematopoiéticas, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos anti-eritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas (NAKAGE et al., 2005).

Os leucócitos podem ser analisados no sangue total com anticoagulante ou podem ser isolados pelo uso da centrifugação por gradiente de densidade. O sangue total evita as alterações celulares associadas à centrifugação por gradiente de densidade. Geralmente, os eritrócitos são removidos pela adição de tampão de lise de hemácias (WEISS, 2002). As variações no tamanho e na granulosidade permitem a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos ou polimorfonucleares.

As amostras de sangue devem ser processadas e analisadas o mais breve possível, já que o processo de estocagem da amostra é um ponto chave na obtenção de resultados precisos, sendo recomendado que as amostras sejam refrigeradas e processadas dentro de quatro horas após a colheita de sangue a fim de se evitar resultados falsos ou inconclusivos (VUORTE et al., 2001). Segundo esses autores, na oxidação do Diacetato 2' 7' Diclorofluoresceína (DCFH), a manutenção da integridade de membrana e da viabilidade celular em todos os estágios de preparação das células é essencial para se evitar a saída do

substrato ou de seus derivados fluorescentes, o que poderia resultar na ocorrência de subgrupos de células com uma falsa redução da intensidade de fluorescência.

Estudos realizados por Jain et al. (1991), em amostras colhidas com EDTA e mantidas em gelo, utilizando a citometria de fluxo para contagem diferencial em leucócitos de vacas holandesas, observaram que as contagens de leucócitos totais foi afetada por um tempo superior a 6 horas entre a coleta e seu processamento.

O tipo de anticoagulante também pode afetar os resultados da análise por citometria. Carter et al. (1992) avaliaram o uso de três anticoagulantes em amostras recém-colhidas e após 24 horas, além da ocorrência de morte celular evidenciada através da incubação destas células com Iodeto de Propídeo (PI). Nas amostras recém-colhidas, não houve diferença estatística relacionada ao número de granulócitos marcados por PI, entretanto a avaliação destas células, após 24 horas em temperatura ambiente, mostrou que as amostras com EDTA apresentaram um aumento significativo do número de granulócitos positivos para PI. A morte celular foi evidenciada nas amostras com ACD (ácido citrato dextrose) e irrelevante naquelas com heparina. O trabalho de Ducusin et al. (2001), sobre a atividade de fagocitose de leucócitos PMN de bovinos para partículas fluorescentes em diferentes condições de incubação (tempo e temperatura), usando diferentes estímulos (LPS, PMA, fMLP e citocalisina B) e diferentes anticoagulantes (heparina, ACD e EDTA) em amostras analisadas dentro de cinco horas após a colheita do sangue, mostraram que a heparina ainda é o anticoagulante de escolha para a fagocitose. Em contrapartida, Erduran et al. (1999), verificaram apoptose dos neutrófilos após uma hora de ensaio quando usadas doses altas de heparina (20 U/ml).

Em se tratando da espécie bovina, podem se tornar um entrave a localização do citômetro em grandes centros urbanos e o tempo decorrido da colheita de sangue até a análise das funções celulares. Trabalhos, nessa espécie animal, avaliando contagem total de

leucócitos, a atividade de fagocitose e o metabolismo oxidativo de PMN do sangue mostram variações no tempo de processamento das amostras que se colocam entre duas a seis horas (JAIN et al., 1991; VAN OOSTEVELDT et al., 1999; DUCUSIN et al., 2001; BOHLAND et al., 2008).

3 OBJETIVO GERAL

Estudar a resposta imune inata de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos "in vitro" pela avaliação da atividade funcional destas células.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar a influência da ingestão de diferentes quantidades de colostro na atividade funcional de neutrófilos sangüíneos de bezerros.

Avaliar a influência do fator etário sobre a atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro".

Avaliar a atividade funcional de neutrófilos do sangue de bezerros neonatos, "in vitro", através da análise da produção espontânea e provocada de peróxido de hidrogênio, utilizando os estímulos de fagocitose das bactérias *S. aureus* e da *E. coli* e o induzido pelo PMA.

Avaliar a atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos "in vitro" pela análise da atividade fagocítica destas células frente a *S. aureus* e a *E. coli*.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizamos o material e a metodologia descrita a seguir.

4.1 Animais

Foram utilizados 15 bezerros machos da raça Holandesa Preto e Branco, nascidos de parto eutócico, de uma fazenda de produção leiteira localizada no Estado de São Paulo, criados sob regime intensivo, acompanhados quanto ao estado de saúde do nascimento até os 10 dias de idade. Os animais eram separados de suas mães imediatamente após o nascimento e receberam os cuidados habituais recomendados no período pós-parto.

4.2 Alimentação e manutenção

Todos os bezerros foram transportados para o Setor Experimental de Clínica de bovinos e pequenos ruminantes do VCM – Hospital Veterinário da FMVZ – USP e mantidos em gaiolas individuais durante os 10 primeiros dias de vida. Os animais eram alimentados com leite 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.

4.3 Exame Físico

Os animais eram avaliados diariamente através de exame físico que incluiu as seguintes análises: 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.

4.4 Avaliação da influência do colostro e da idade

Para a avaliação da influência da ingestão de colostro e da idade sobre a atividade funcional de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro”, foi utilizada a metodologia mencionada a seguir.

4.4.1 Avaliação da influência do colostro

Os animais, imediatamente após o nascimento, foram distribuídos em três grupos com cinco bezerros cada:

Grupo 1 (G1): os bezerros deste grupo receberam quatro litros de colostro, divididos em duas alimentações de dois litros cada, com intervalo de oito horas, sendo a primeira realizada dentro das primeiras seis horas pós-nascimento (p.n.). Nos dias seguintes foi fornecido leite em quantidade equivalente a 10% do peso vivo/dia, dividido em duas alimentações diárias, utilizando-se mamadeira.

Grupo 2 (G2): os bezerros deste grupo receberam dois litros de colostro, fornecidos nas primeiras seis horas de vida, e passaram a receber leite em quantidade equivalente a 10% do peso vivo/dia, divididos em duas alimentações diárias fornecidas através de mamadeira.

Grupo 3 (G3): os bezerros deste grupo receberam quatro litros de leite, divididos em duas alimentações de dois litros cada, com intervalo de oito horas, sendo a primeira realizada dentro das primeiras seis horas pós-nascimento (p.n.). Nos dias seguintes receberam leite em quantidade equivalente a 10% do peso vivo/dia, dividido em duas alimentações diárias fornecidas através de mamadeira.

4.4.2 Avaliação da influência do fator etário

A influência da idade sobre a atividade funcional dos neutrófilos PMN do sangue contra a ECET foi verificada através da realização da colheita das amostras de sangue nos seguintes momentos:

- Tempo 0 (zero) (t0): colheita realizada no primeiro dia de vida, antes da ingestão do colostro (G1 e G2) ou da primeira ingestão de leite (G3)
- Tempo 1 (t1): após a ingestão do colostro até 48 hs após o nascimento (p.n.)
- Tempo 2 (t2): de 48hs até 96 horas p.n.
- Tempo 3 (t3): de 96 horas até 144 horas p.n.
- Tempo 4 (t4): de 144 horas até 192 horas p.n.
- Tempo 5 (t5): de 192 horas até 240 horas p.n.

4.5 Colheita das amostras

Foram colhidos cinco ml de sangue por punção da veia jugular externa, utilizando agulha 25 x 8 mm e tubo à vácuo contendo heparina sódica como anticoagulante. Após a colheita, a amostra foi colocada imediatamente em banho de gelo (MASSOCO-SALLES GOMES, 2003), sendo analisada em até quatro horas (SMITS; BURVENICH; HEYNEMAN, 1997).

4.6 Reagentes

Cepa de *S. aureus* marcada com Iodeto de Propídeo

Staphylococcus aureus (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (*Sigma, St Louis, MO*) utilizado para analisar a atividade de fagocitose de neutrófilos do sangue de bezerros e como estímulo para desencadear a produção de peróxido de hidrogênio e o metabolismo oxidativo. A bactéria utilizada foi preparada seguindo o protocolo utilizado de rotina no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Patologia da FMVZ da Universidade de São Paulo, conforme descrito a seguir.

Para a utilização das bactérias nas técnicas de fagocitose e do metabolismo oxidativo, foi necessária a conjugação com iodeto de propídeo (PI), conforme protocolo de conjugação proposto por Hasui et al. (1989) para *Staphylococcus aureus* e utilizado por Silva (2003) e Massoco-Salles Gomes (2003). As bactérias foram cultivadas em ágar sangue por 48 horas. Colocadas em tubos *Falcon* estéreis, em fluxo laminar próprio para bactérias. Foram ressuspensas em 10 ml de solução salina à 0,85% e centrifugadas por 10 minutos a 2500

rpm. Posteriormente, as bactérias foram mortas a 60°C por 30 minutos, lavadas por três vezes com solução salina à 0,85% e, após cada lavagem, centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm. A concentração de *S. aureus*, marcada com PI, utilizada foi ajustada de modo que a leitura em espectrofotômetro (Uv/visível) a um comprimento de onda de 620 nm apresentasse um valor próximo a 2,4 o que corresponde ao número 8 da escala de Mc Farland.

Ajustadas as concentrações de bactérias, estas foram novamente centrifugadas nas mesmas condições, desprezando o sobrenadante e adicionando 25 µl de solução de iodeto de propídeo a 5%. Seguindo o protocolo, as bactérias eram então incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e, posteriormente, as bactérias marcadas foram lavadas por três vezes em solução salina a 0,85% e centrifugadas novamente (três vezes) por 10 minutos a 2500 rpm. Finalmente as bactérias foram ressuspensas em 5,0 ml de PBS glicosado e aliquotadas em tubos tipo “*ependorfs*” de 2ml, protegidas da luz, devidamente identificadas e congeladas a -80°C. Sendo descongeladas imediatamente antes do uso.

Cepa de *E. coli* marcada com Alexa Fluor

Escherichia coli (cepa K12), marcada com Alexa Fluor 594 (E-23370, *Molecular Probes, Eugene, OR*), foi utilizada para analisar a atividade fagocítica de neutrófilos sangüíneos e como estímulo do metabolismo oxidativo. Antes do uso, a bactéria liofilizada, foi mantida a temperatura menor que menos 20 graus Celsius, no dessecador e protegida da luz.

A bactéria foi reconstituída seguindo as recomendações do fabricante, conforme segue descrito. Para a reconstituição foi utilizado, como tampão, 2,0 (dois) ml de PBS com azida de sódio a 2mM que foi adicionado ao frasco que continha as bactérias. Em seguida, o frasco era tampado e homogeneizado por movimentos circulares. Depois, as bactérias eram agitadas

vigorosamente no agitador de tubos (por 3 vezes durante 15 segundos) e aliquotadas em tubos do tipo "eppendorf", num volume de 200 µl cada, identificados e mantidos em “freezer” a temperatura de menos 80 graus Celsius, protegidos da luz. Antes da utilização, as bactérias eram descongeladas e colocadas no sonicador por 3 vezes, durante 20 segundos para obtenção de uma suspensão de bactérias o mais homogênea possível.

Solução de PMA

Miristato-acetato de forbol (*Sigma, St Louis, MO*): foi utilizado como estímulo para desencadear a produção de peróxido de hidrogênio. No momento do uso, conforme descrito a seguir, a solução de PMA foi preparada utilizando-se 1 µl da solução de estoque (100 ng/100µl), completando-se o volume com 999 µl de PBS. Este volume final de 1,0 ml é suficiente para desencadear a produção de peróxido de hidrogênio e o metabolismo oxidativo em 10 amostras de sangue (SILVA, 2003; MASSOCO-SALLES GOMES, 2003).

Solução de DCFH-DA

Diacetato 2’7’ diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA/*Molecular Probes, Eugene, OR*) foi empregado para se determinar a produção de peróxido de nitrogênio basal e estimulada. Este reagente foi mantido congelado (-20°C) e protegido da luz. No momento do uso, a solução estoque (25mM diluída em etanol) foi diluída em PBS de forma que o volume final desta solução fosse o suficiente para realizar o experimento. Por exemplo: 50 µl de DCFH-DA da solução estoque adicionado em 4,1 ml de PBS (SILVA, 2003; MASSOCO-SALLES GOMES, 2003).

4.7 Avaliação do metabolismo oxidativo

Para a análise do metabolismo oxidativo de neutrófilos do sangue de bezerros neonatos, foi utilizado o método proposto por Massoco-Salles Gomes (2003), desencadeado por diferentes estímulos. Os estímulos utilizados para desencadear o metabolismo oxidativo de neutrófilos foram: *E. coli* marcada com Alexa Fluor (aproximadamente $3,8 \times 10^6$ bactérias), *S. aureus* marcado com PI e PMA.

4.7.1 Estímulo com *S.aureus* marcada com PI

Em um tubo de polipropileno foram adicionados 100 µl de sangue total heparinizado, 200 µl de DCFH – DA (0,3 mM) e 100 µl de *S.aureus* marcada com PI e PBS q.s.p. 1 ml.

4.7.2 Estímulo com *E. coli* marcada com Alexa Flúor

Em um tubo de polipropileno foram adicionados 100 µl de sangue total heparinizado, 200 µl de DCFH – DA (0,3 mM) e 20 µl de ECET marcada com PI e PBS q.s.p. 1 ml.

4.7.3 Estímulo com PMA

Em um tubo de polipropileno foram adicionados 100 µl de sangue total heparinizado, 200 µl de DCFH – DA (0,3 mM) e 100 µl de PMA e PBS q.s.p. 1 ml.

4.8 Análise da fagocitose por citometria de fluxo

A análise da fagocitose foi efetuada pelo método proposto por Hasui et al (1989) e Massoco–Salles Gomes (2003), utilizando a *E. coli* marcada com Alexa Fluor e a *S. aureus* marcada com PI.

4.8.1 Fagocitose estimulada por *S.aureus* marcada com PI

Em um tubo de polipropileno eram adicionados 100 µl de sangue total heparinizado, 100 µl de *S.aureus* marcada com PI e PBS q.s.p. 1 ml.

Dessa forma, o quadro 1, exemplifica a bateria de tubos que foi utilizada para avaliar a atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos "in vitro", independente do grupo de estudo e do momento da análise

4.8.2 Atividade fagocítica utilizando a *E. coli* marcada com Alexa Fluor

Para tanto, eram adicionados nos tubos de polipropileno: 100 µl de sangue total heparinizado, 20 µl de *E. coli* marcada com Alexa Fluor, e P.B.S. q.s.p. 1 ml.

Tubo	Sangue total	DCFH - DA	<i>S. AUREUS</i>	<i>E. COLI</i>	PMA	PBS
A (controle negativo)	100 µl	-	-	-	-	900 µl
B (metab. oxidativo basal)	100 µl	200 µl	-	-	-	700 µl
C (metab. induz. <i>S. aureus</i>)	100 µl	200 µl	100 µl	-	-	600 µl
D (fagocitose <i>S. aureus</i>)	100 µl	-	100 µl	-	-	800 µl
E (metab. induz. <i>E. coli</i>)	100 µl	200 µl	-	20 µl	-	680 µl
F (fagocitose <i>E. coli</i>)	100 µl	-	-	20 µl	-	880 µl
G (metab. induz. PMA)	100 µl	200 µl	-	-	100 µl	600 µl

Quadro 1 - Exemplo de uma bateria de tubos utilizados para avaliar a atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos "in vitro" - São Paulo – 2008

4.9 Mensuração do metabolismo oxidativo e da fagocitose

As amostras de sangue de cada um dos tubos descritos anteriormente foram incubadas em estufa, durante 30 minutos, com temperatura controlada a 37°C, sendo agitadas a cada 10 minutos. As reações eram interrompidas pela adição de 2,0 ml de solução gelada de EDTA (3mM) e centrifugadas por 10 minutos a 250 G, sendo os eritrócitos removidos dos botões de leucócitos do sangue periférico por lise hipotônica, com uma solução estéril de NaCl a 0,2 % (2,0 ml) durante 20 segundos. Imediatamente após a lise hipotônica foi adicionada uma solução estéril de NaCl 1,6% em cada amostra com o objetivo de restaurar a isotonicidade. Repetiu-se a lise hipotônica, os tubos foram centrifugados pela última vez e o sobrenadante desprezado. Os botões celulares foram ressuspensos, adicionando aos tubos 500 µl de PBS para a análise no citômetro de fluxo (SÁ-ROCHA, 2006).

O preparo das soluções de EDTA 3mM, da solução salina em diferentes concentrações e do PBS utilizadas neste experimento seguiu o protocolo descrito por Silva (2003).

4.10 Leitura das amostras no Citômetro de Fluxo

Após a etapa descrita foi realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo (*Facscan Calibur Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*) conectado a um computador (*Macintosh Apple, CA, USA*) utilizando o software Cell Quest (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*) do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram adquiridos e analisados 10.000 eventos de cada amostra. Os polimorfonucleares do sangue foram identificados conforme as características de tamanho (FSC) e complexidade interna da célula (SSC). A atividade funcional dos polimorfonucleares do sangue dos bezerros neonatos "in vitro", metabolismo oxidativo e fagocitose, foi medida pela intensidade de fluorescência média obtida para cada um dos estímulos utilizados. Os resultados de fluorescência foram gravados em uma escala logarítmica. A fluorescência verde obtida após a oxidação do DCFH em DCF, foi mensurada a 530 ± 30 nm (FL1) e a fluorescência vermelha das bactérias: *S. aureus* marcada com PI e da *E.coli* conjugada com Alexa Fluor 594 foi medida a 585 ± 42 nm (FL2).

Os valores referentes aos resultados do metabolismo oxidativo basal e induzido pelos diferentes estímulos utilizados, foram estimados pela média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos polimorfonucleares.

A magnitude de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas) foi registrada pelo valor da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de polimorfonucleares do sangue, frente a cada uma das bactérias utilizadas para desencadear tal processo. O percentual de fagocitose, ou seja, o número total de polimorfonucleares que fagocitaram a *E. coli* marcada pelo Alexa Flúor e a *S. aureus* marcada com PI foi obtido através do número de polimorfonucleares que fagocitaram sobre o número total de células polimorfonucleares multiplicadas por 100, segundo a fórmula:

$$\text{Porcentagem de fagocitose} = \frac{\text{número de PMN que fagocitaram}}{\text{número total de PMN}} \times 100$$

Os resultados adquiridos foram posteriormente analisados utilizando o software para análise de dados de citometria FlowJo 7.2.2 (*Tree Star, Inc., Ashland, OR*).

4.11 Exames Complementares

O material colhido para esta finalidade foi processado no Laboratório Clínico de Rotina do Departamento de Clínica Médica da FMVZ – USP.

4.11.1 Leucograma

Para a contagem total de leucócitos, as amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa utilizando agulhas 25 x 8 mm em tubos à vacuo siliconizado com EDTA sódico com capacidade para 5,0 ml de sangue do sistema Vacutainer®, sendo refrigeradas a 4°C até o momento do exame. Os esfregaços sangüíneos, para a contagem diferencial de leucócitos, foram confeccionados com sangue fresco sem EDTA, segundo recomenda Birgel (1982). A contagem total de leucócitos foi realizada com auxílio de contador automático de células para hematologia (ABC Vet® - ABX™). Para a contagem diferencial de leucócitos, as lâminas de esfregaço sangüíneo eram primeiramente coradas pelo Método de Rosenfeld e utilizando-se um microscópio óptico, foram identificados e contados 100 leucócitos. Como valores de referência foram utilizados dados do trabalhos de Benesi (1992) e Teixeira (1999).

4.11.2 Proteinograma e avaliação da atividade sérica da Gamaglutamiltransferase

Para essa avaliação, as amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular externa, com o uso de tubos a vácuo siliconizados sem anticoagulante (Vacutainer®). Após a colheita, as amostras eram centrifugadas por 05 minutos, a 3500 rpm sendo o soro sangüíneo separado e fracionado em três alíquotas, adequadamente identificadas e armazenadas sob congelamento a -20°C até o momento da execução dos testes.

Determinação de proteínas totais e fracionamento eletroforético de proteínas

As proteínas totais foram quantificadas em analisador bioquímico automático (Modelo Liasys®, AMS, Rome, Italy) utilizando-se o método do biureto. O fracionamento eletroforético das proteínas séricas foi realizado, em fitas de acetato de celulose, segundo as técnicas modificadas por Friedman (1961) e Kremers, Briere e Batsakis (1967). Como referência, foram utilizados trabalhos nacionais com valores de referência de bezerros sadios (BORGES;1997; FEITOSA, 1998; LEAL et al., 2003).

Determinação da atividade sérica da Gamaglutamiltransferase

A taxa de gama glutamil transferase sérica (GGT) foi determinada em analisador bioquímico automático (Modelo Liasys®, AMS, Rome, Italy), utilizando-se kit comercial, segundo técnica modificada de Szasz et al. (1969). Foram utilizados como referência para este estudo os resultados obtidos por Feitosa (1998) e Benesi et al. (2003)

4. 11. 3 Determinação das imunoglobulinas IgM, IgG e IgG₁

As amostras de soro para a determinação de imunoglobulinas foram mantidas congeladas a -20° C até o momento do uso.

A avaliação quantitativa das imunoglobulinas foi efetuada através do método de imunodifusão radial (Mancini et al, 1965), utilizando um kit comercial composto de placas de ágar impregnadas com anticorpos específicos para as classes de imunoglobulinas IgM, IgG e IgG₁ de bovinos. O procedimento de dosagem de cada uma das imunoglobulinas foi essencialmente o mesmo, sumarizado a seguir. As placas, apresentavam 12 poços. Nos primeiros quatro, foram pipetados 3 µl do soro padrão com concentração de imunoglobulinas conhecida. Nos poços restantes era pipetado o mesmo volume de soro das amostras dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, dos referentes aos tempos t₀ (antes da ingestão de colostro) e t₂ (de 48hs até 96 horas p.n.). Após o preparo, as placas foram fechadas e mantidas por 18 a 24 horas em temperatura ambiente. O diâmetro (mm) dos anéis foi mensurado, usando a escala graduada da própria placa. Estabelecida a curva padrão, foram determinados os valores séricos de imunoglobulinas, para cada uma das amostras testadas, seguindo a orientação do fabricante do Kit (Single Radial Immunodifusion Kit, *VMRD, Inc., Pullman, WA*).

4.12 Análise Estatística

Para a comparação entre as médias dos resultados da avaliação da função de polimorfonucleares do sangue de bezerros "in vitro" (fagocitose e metabolismo oxidativo) em cada um dos grupos de animais (G1, G2 e G3) e a influência da idade e do volume de

colostro mamado, bem como os resultados obtidos na análise das funções vitais, leucograma, proteinograma e avaliação da atividade sérica da Gamaglutamiltransferase e determinação das imunoglobulinas: (IgM, IgG e IgG₁) foram utilizados primeiramente os testes de Levene's e do qui-quadrado de Bartlet, para que se pudesse verificar qual teste paramétrico ou não paramétrico, seria o mais adequado. Os dados com distribuição normal foram submetidos a análise de variância (ANOVA one way) complementada pelo teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações. Os dados não paramétricos, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner para múltiplas comparações. Para a comparação entre o metabolismo oxidativo basal e estimulado com *S. aureus*, *E. coli* e PMA, para cada grupo e faixa etária, foi utilizado o teste t para amostras pareadas. Para todas as análises foi considerado um nível de significância menor que 5%. Os dados foram analisados através do programa *Stats Direct Statistical software, version 2,6,6*.

5. RESULTADOS

Os animais foram avaliados diariamente através de exame físico que incluiu a verificação 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. A tabela 1 mostra os valores das médias e desvios-padrão das funções vitais dos três grupos experimentais, de acordo com a idade, ilustrados nas figuras 1 a 3.

Ao exame físico, tanto os animais do grupo 1, que mamaram 4,0 litros de colostro, quanto os animais do grupo 2, alimentados com 2,0 litros de colostro ao nascimento, não apresentaram alterações, principalmente no que se refere ao estado de hidratação e ao grau de depressão clínica. Os animais destes dois grupos apresentavam-se alertas, com olhos brilhantes e turgor de pele normal e apresentavam reflexo de sugação adequado. O padrão de comportamento clínico dos animais do grupo 3, que receberam somente leite ao nascimento, foi semelhante aos animais dos grupo 1 e 2, exceto para um animal deste grupo que veio a óbito, 3 dias após o nascimento em virtude de um choque séptico/endotoxêmico, sendo por esta razão substituído. O exame microbiológico de fragmentos de órgãos deste animal demonstrou a presença da bactéria *Escherichia coli* em fígado e canela e *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. nas amostras de intestino.

Considerando o escore fecal, entre os animais do grupo 1, todos os animais apresentaram fezes pastosas, principalmente após o tempo t2. Dentre os animais do grupo 2, quatro apresentaram diarreia líquida. Dos animais do grupo 3, três apresentaram diarreia líquida: um após o tempo t1 e dois após o tempo t2; e dois, fezes pastosas. O umbigo de todos os animais era curado com iodo a 5% durante os três primeiros dias de vida e não foram observadas alterações inflamatórias no processo de cicatrização umbilical em nenhum dos

animais dos grupos 1 e 2. Dentre os bezerros do grupo 3, um animal apresentou uma hérnia umbilical e dois apresentaram demora no secamento do cordão umbilical.

O animal 5 do grupo 1 apresentou conjuntivite e o animal 3 do grupo 2 apresentou uma úlcera de córnea, sendo os dois tratados sem maiores complicações. Dois animais do grupo 3 apresentaram concomitante ao quadro de diarreia líquida, respiração ruidosa, tosse e corrimento nasal bilateral. Os animais deste grupo que apresentaram diarreia e sinais associados à doença respiratória foram tratados com Enrofloxacina (Kinetomax®), por via IM, na dose de 3,0 ml para cada 40 Kg P.V., conforme as instruções do fabricante.

Tabela 1 - Valores médios e desvios padrão das funções vitais: temperatura, frequência de movimentos respiratórios e frequência de batimentos cardíacos de bezerros neonatos que receberam quatro litros de colostro (grupo1), dois litros de colostro (grupo 2) e leite (grupo3) ao nascimento, segundo a idade- São Paulo - 2008

Parâmetro	Grupo	t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	t1 (até 48 hs. p.n.)	t2 (48 - 96 hs. p.n.)	t3 (96 - 144 hs. p.n.)	t4 (144-192 hs. p.n.)	t5 (192-240 hs.p.n.)
Temperatura retal (°C)	1 (n=5)	38,64±0,5 aA ¹	38,92±0,5 aA	38,66±0,2 aA	39,16±0,3 aA	38,84±0,4 aA	39,10±0,3 aA
	2 (n=5)	39,18±0,4 aA	38,36±0,5 aB	38,72±0,2 aAB	38,90±0,1 aAB	38,72±0,4 aAB	38,88±0,3 aAB
	3 (n=5)	38,9±0,4 aA	38,4±0,5 aA	38,8±0,3 aA	38,9±0,3 aA	39,1±0,5 aA	38,9±0,4 aA
Frequência Respiratória /min.	1 (n=5)	54,40±12,2 aAB	50,80±10,5 aAB	56,80±17,8 aA	41,60±14,6 aAB	37,60±5,4 aAB	32,00±6,9 aB
	2 (n=5)	57,00±14,8 aA	45,60±10,0 aAB	34,80±18,6 aAB	24,80±5,2 aB	28,00±4,9 aB	40,80±9,1 aAB
	3 (n=5)	53,2±26,4 aA	59,2±12,5 aA	44,8±11,1 aA	41,6±10,0 aA	39,6±13,3 aA	40,8±18,0 aA
Frequência Cardíaca / min.	1 (n=5)	143,20±20,0 aA	137,60±29,7 aA	124,00±10,6 aA	136,00±30,1 aA	128,00±26,4 aA	115,60±13,7 aA
	2 (n=5)	176,00±23,0 aA	149,20±23,7 aAB	135,60±46,8 aAB	124,40±23,9 aAB	117,20±16,7 aB	148,80±17,5 aAB
	3 (n=5)	135,8±30,8 aA	137,6±26,8 aA	120,4±17,1 aA	124,4±11,3 aA	113,6±22,7 aA	115,6±28,6 aA

¹ letras minúsculas diferentes na mesma coluna, indicam resultados com diferenças significativas (p<0,05), em cada parâmetro e entre grupos
letras maiúsculas diferentes na mesma linha, indicam resultados com diferenças significativas (p<0,05), em cada grupo, e entre os tempos de vida

Figura 1 - Valores médios da temperatura retal de bezerros neonatos, segundo o volume de colostro ingerido (4,0 litros - G1; 2,0 litros - G2; somente leite - G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008

Figura 2 - Valores médios da frequência de movimentos respiratórios por minuto de bezerros neonatos, segundo o volume de colostro ingerido (4,0 litros - G1; 2,0 litros - G2; somente leite - G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008

Figura 3 - Valores médios dos batimentos cardíacos por minuto de bezerros neonatos, segundo o volume de colostro ingerido (4,0 litros - G1; 2,0 litros - G2; somente leite - G3) e a evolução da idade - São Paulo – 2008

5.1 Atividade funcional de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro”

Os resultados referentes à análise da atividade funcional de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos "in vitro", serão apresentados na seguinte ordem: primeiramente os resultados do metabolismo oxidativo e da fagocitose de cada um dos grupos estudados. Em seguida, os dados obtidos na comparação entre os grupos.

Inicialmente, serão apresentados os valores referentes ao metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro", não estimulados (DCFH) e estimulados respectivamente por *S. aureus*, *E. coli* e PMA. Posteriormente, serão apresentados os dados obtidos na análise da atividade de fagocitose dos PMN do sangue de bezerros neonatos segundo o estímulo (células não estimuladas, *S. aureus* e *E. coli*), sendo consideradas nesta análise a intensidade de fluorescência das células e o percentual de PMN em fagocitose.

Os tempos t0 a t5, referem-se respectivamente à idade dos animais no momento em que foram realizadas as colheita das amostras, ou seja: tempo t0 - ao nascer (antes da mamada do colostro: 4,0 litros (G1), 2,0 litros (G2) ou da primeira ingestão de leite (G3)); tempo t1 - após a ingestão do colostro até 48 hs. p.n.; tempo t2 - de 48hs até 96 horas p.n.; tempo t3 - de 96 horas até 144 horas p.n.; tempo t4 - de 144 horas até 192 horas p.n.; tempo t5 - de 192 horas até 240 horas p.n.

Exemplos de citogramas que foram utilizados na análise individual das populações celulares de cada um dos grupos de animais estudados, segundo os diferentes estímulos são mostrados nas figuras 56 – 62 (Anexo).

5.1.1 Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 1

Serão apresentados os resultados referentes a atividade funcional de bezerros que mamaram 4,0 litros de colostro p.n.

5.1.1.1 Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

A tabela 2 mostra os valores médios da intensidade de fluorescência e desvios-padrão de PMN do sangue de bezerros "in vitro", incubados respectivamente com DCFH, DCFH + *S. aureus*, DCFH + *E. coli* e DCFH + PMA. Pode-se observar que não houve diferenças em relação à produção de radicais de oxigênio pelos PMN não estimulados nos diferentes momentos em que as amostras foram colhidas. Este fato se repetiu quando estas células foram estimuladas pelo PMA. O desencadeamento do metabolismo oxidativo estimulado pela *S. aureus*, mostrou que houve um aumento significativo da produção de peróxido de hidrogênio

a partir do tempo t1, ou seja, após a mamada de 4,0 litros de colostro, que se manteve constante nos tempos t2 e t3 e diminuiu significativamente em t4 e t5. Em relação a *E. coli* houve um aumento significativo do metabolismo oxidativo após a mamada do colostro (t1) e que se manteve em t2, ou seja, até 96 horas p.n.

As figuras 4 a 7 mostram, respectivamente, as médias da intensidade de fluorescência de PMN após a produção espontânea de H₂O₂ e estimulada pela *S. aureus* marcada com PI, *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594 e o PMA.

A comparação entre a resposta de PMN não estimulados (metabolismo basal) e após cada um dos estímulos utilizados (*S. aureus*, *E.coli* e PMA, respectivamente) pode ser observada nas figuras 8 a 10. A figura 8 mostra um aumento significativo da intensidade de fluorescência quando as células foram incubadas com *S. aureus*. Quando a *E.coli* foi utilizada como estímulo para desencadear o metabolismo oxidativo de PMN do sangue, as maiores e significativas diferenças na intensidade de fluorescência ocorreram após t0, ou seja, após a mamada do colostro (Figura 9). A intensidade de fluorescência dos PMN do sangue incubados com PMA foi maior em todos os tempos do estudo.

Tabela 2 - Valores das médias e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência obtida na análise do metabolismo oxidativo espontâneo (basal) (DCFH-DA) e estimulado pela *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (DCFH + *S. aureus*), *Escherichia coli* (cepa K12), marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + *E. coli*) e 12 - Miristato 13-acetato de forbol (PMA) de PMN do sangue de bezerros, "in vitro", que receberam 4,0 litros de colostro ao nascer, segundo a idade- São Paulo - 2008

Condição	idade					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
	(antes da ingestão de colostro/leite) (n = 5)	(até 48 hs. p.n.) (n = 5)	(48 - 96 hs. p.n.) (n = 5)	(96 - 144 hs. p.n.) (n = 5)	(144-192 hs. p.n.) (n = 5)	(192-240 hs.p.n.) (n = 5)
DCFH - DA	16,60±4,7 A ¹	30,93±8,9 A	27,33±14,9 A	20,88±3,8 A	20,08±4,1 A	20,62±7,5 A
DCFH + <i>S. aureus</i>	40,49±6,4 A	188,23±78,4 B,C	215,36±84,8 B	162,60±29,6 B,C	96,54±49,5 A,C	97,03±45,7 A,C
DCFH + <i>E. coli</i>	17,78±9,2 A	42,73±9,9 B	43,12±21,2 B	31,25±7,7 A,B	32,54±7,8 A,B	28,26±12,2 A,B
DCFH + PMA	240,55±153,0 A	238,27±184,0 A	390,93±195,0 A	224,32±75,3 A	301,53±141,0 A	234,58±103,0 A

¹valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, indicam resultados significativos (p<0,05)

Figura 4 - Produção espontânea de H_2O_2 , medida pela média da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro, segundo a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 5 - Metabolismo oxidativo de PMN do sangue, de bezerros que ingeriam 4,0 litros de colostro, incubados com *S. aureus* marcado com PI e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 6 - Valor médio e desvios-padrão da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros do Grupo 1, incubados com DCFH e *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594 e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 7 - Produção de H_2O_2 por PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro, estimulada por PMA e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 8 – Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com *S. aureus* marcado com PI (DCFH + *S. aureus*), de animais que ingeriram 4,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

Figura 9 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com *E. coli* marcada com Alexa Flúor 594 (DCFH + *E. coli*), de animais que ingeriram 4,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

Figura 10 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com PMA (DCFH + PMA), de animais que ingeriram 4,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

5.1.1.2 Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

A tabela 3, mostra a atividade fagocítica dos PMN do sangue para *S. aureus* e *E. coli*. A intensidade de fluorescência das células sangüíneas, em especial, os polimorfonucleares, após terem sido incubadas com *S. aureus*, foi maior e significativa no tempo t1, t2 e t4 quando comparada ao tempo t0, não houve diferenças nos demais tempos. O percentual de fagocitose de PMN do sangue para *S. aureus* foi maior do que t0 (após a ingestão do colostro) em todos os tempos (t1 a t5) (Tabela 4 e Figura 12), mostrando a influência da ingestão do colostro sobre esta função dos PMN. Utilizando a *E. coli* como estímulo, não foram observadas diferenças na intensidade nem no percentual de fagocitose em nenhum dos tempos estudados (Tabela 5, Figuras 13 e 14).

Tabela 3 - Valores das médias e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", não estimulados (célula) e estimulados pela *S.aureus* marcada pelo iodeto de propídeo e pela *E. coli* marcada com Alexa Fluor, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 4,0 litros de colostro - São Paulo - 2008

Condição	idade					
	t0 (antes da ingestão de colostro/leite) (n = 5)	t1 (até 48 hs. p.n.) (n = 5)	t2 (48 - 96 hs. p.n.) (n = 5)	t3 (96 - 144 hs. p.n.) (n = 5)	t4 (144-192 hs. p.n.) (n = 5)	t5 (192-240 hs.p.n.) (n = 5)
célula	6,31±1,4 A ¹	6,94±1,2 A	6,47±1,2 A	7,52±0,9 A	8,56±2,8 A	9,05±0,9 A
célula + <i>S. aureus</i>	17,70±6,9 A	77,33±30,0 B,C	78,41±41,3 B,C	62,49±26,5 A,C	84,68±10,5 B,C	53,29±19,2 A,C
célula + <i>E. coli</i>	28,64±11,1 A	28,83±9,3 A	24,46±9,0 A	26,58±5,6 A	28,68±8,0 A	34,83±8,0 A

¹letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativos (p<0,05)

Tabela 4 - Valores das médias e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela *S.aureus* marcada pelo iodeto de propídeo e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 4,0 litros de colostro - São Paulo - 2008

Idade	cel+ <i>S.aureus</i>	% de fagocitose
t0 (n = 5)	17,70±6,9 a ¹	63,50±25,0 a
t1 (n = 5)	77,33±30,0 b,c	93,29±14,1 b
t2 (n = 5)	78,41±41,3 b,c	98,23±2,7 b
t3 (n = 5)	62,49±26,5 a,c	98,80±1,3 b
t4 (n = 5)	84,68±10,5 b,c	99,47±0,3 b
t5 (n = 5)	53,29±19,2 a,c	96,10±5,5 b

¹valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativos p<0,05

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 11 - Atividade fagocítica, medida pela intensidade de fluorescência, de PMN para *S. aureus* marcado com PI de bezerros que ingeriram 4,0 litros de colostro e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 12 - Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para *S. aureus*, antes (t0) e após a ingestão de 4,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Tabela 5 - Valores das médias e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela *E. coli* marcada por Alexa Fluor 594 e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 4,0 litros de colostro - São Paulo - 2008

Idade	cel+ <i>E coli</i>	% de fagocitose
t0 (n = 5)	28,64±11,1 a ¹	45,37±30,3 a
t1 (n = 5)	28,83±9,3 a	56,89±24,1 a
t2 (n = 5)	24,46±9,0 a	55,25±14,6 a
t3 (n = 5)	26,58±5,6 a	57,86±15,1 a
t4 (n = 5)	28,68±8,0 a	37,61±17,4 a
t5 (n = 5)	34,83±8,0 a	38,19±9,5 a

¹letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativos p<0,05

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 13 - Fagocitose de leucócitos PMNs para *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594, de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro e a idade - São Paulo - 2008

Figura 14 - Percentual de fagocitose de PMNs do sangue de bezerros neonatos para *E. coli*, antes (t0) e após a ingestão de 4,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

5.1.2 Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 2

Serão apresentados os resultados referentes a atividade funcional de bezerros que mamaram 2,0 litros de colostro p.n.

5.1.2.1 Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

A tabela 6, mostra os valores médios da intensidade de fluorescência e desvios-padrão de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro", incubados respectivamente com DCFH, DCFH + *S. aureus*, DCFH + *E. coli* e DCFH + PMA.

O metabolismo oxidativo basal de PMN do sangue não diferiu entre os animais que receberam 2,0 litros de colostro em nenhum dos tempos do estudo (Figura 15). Todavia, quando o metabolismo basal dos neutrófilos foi induzido pela *S. aureus* houve um aumento significativo da intensidade de fluorescência após a ingestão de colostro (ou seja, a partir de t1) (Figura 16). Para a *E. coli*, este aumento ocorreu em menor intensidade, porém foi significativo no tempo t2, quando comparado a t0 (Figura 17). O PMA desencadeou uma resposta significativa, mostrada pela intensidade de fluorescência das amostras de cada um dos tempos, não havendo, entretanto, diferenças entre as mesmas (Figura 18).

As figuras 19 a 21, mostram a comparação entre resposta de PMN não estimulados (metabolismo basal) e após cada um dos estímulos utilizados (*S. aureus*, *E.coli* e PMA, respectivamente) medida pela média da intensidade de fluorescência destas células. A comparação entre os resultados do metabolismo basal e estimulado por *S.aureus* em cada um dos tempos, mostrou diferenças nos tempos t0 a t3. A *E. coli* provocou uma maior liberação

de peróxido de hidrogênio nos momentos compreendidos entre t2 e t4. O PMA desencadeou uma resposta maior e significativa em todos os tempos quando comparadas ao metabolismo basal.

Tabela 6 - Valores das médias geométricas e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência obtida na análise do metabolismo oxidativo espontâneo (basal) (DCFH-DA) e estimulado pela *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (DCFH + *S. aureus*), *Escherichia coli* (cepa K12) marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + *E. coli*) e 12 - Miristato 13-acetato de forbol (PMA) de PMN do sangue de bezerros, "in vitro", que receberam 2,0 litros de colostro ao nascer, segundo a idade - São Paulo, 2008.

Condição	idade					
	t0 (antes da ingestão de colostro/leite) (n = 5)	t1 (até 48 hs. p.n.) (n = 5)	t2 (48 - 96 hs. p.n.) (n = 5)	t3 (96 - 144 hs. p.n.) (n = 5)	t4 (144-192 hs. p.n.) (n = 5)	t5 (192-240 hs.p.n.) (n = 5)
DCFH - DA	22,29±2,3 A ¹	24,45±5,3 A	26,98±3,4 A	25,85±5,4 A	22,38±5,4 A	25,22±8,6 A
DCFH + <i>S. aureus</i>	37,11±3,4 A	102,90±68,4 A,B	189,81±120,2 B	193,24±123,2 B	50,34±29,4 A,B	52,58±28,3 A,B
DCFH + <i>E. coli</i>	24,39±3,3 A	28,26±5,3 A,B	38,23±7,4 B	35,71±8,4 A,B	27,57±4,7 A,B	28,86±10,0 A,B
DCFH + PMA	329,47±42,4 A	290,65±113,9 A	490,41±182,6 A	584,84±251,3 A	535,16±242,4 A	502,48±247,8 A

¹letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados com diferenças significativas (p<0,05)

Figura 15 - Produção espontânea de H_2O_2 , medida pela média geométrica da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro, segundo a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 16 - Metabolismo oxidativo de PMN do sangue, de bezerros que ingeriam 2,0 litros de colostro, incubados com *S. aureus* marcado com PI e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 17 - Valor médio e desvios-padrão da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros que ingeriam 2,0 litros de colostro, incubados com DCFH e *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594 e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 18. Produção de H_2O_2 por PMN do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro, estimulada por PMA e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 19 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com *S. aureus* marcado com PI (DCFH + *S. aureus*), de animais que ingeriram 2,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

Figura 20 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com *E. coli* marcado com Alexa Flúor 594 (DCFH + *E. coli*), de animais que ingeriram 2,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

Figura 21 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com PMA (DCFH + PMA), de animais que ingeriram 2,0 litros de colostro segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

5.1.2.2 Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

Nas tabelas 7 e 8, pode-se observar o aumento da intensidade de fluorescência de PMN estimulados pela *S.aureus* nos momentos t2 e t3, após a ingestão de 2,0 litros de colostro, e uma significativa diminuição da fluorescência em t5 quando comparado a t3. Os demais resultados foram semelhantes aos encontrados no tempo t0 (Figura 22). O percentual de fagocitose para esta bactéria foi maior do que t0 em todos os outros momentos (t1 a t5) (Figura 23). A intensidade e o percentual de fagocitose por *E. coli* não diferiram entre os tempos. (Tabela 9 e Figuras 24 e 25).

Tabela 7 - Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da intensidade de fagocitose obtida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", não estimulados (célula) e estimulados pela *S.aureus* marcada pelo iodeto de propídeo e pela *E. coli* marcada com Alexa Flúor 594, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 2,0 litros de colostro - São Paulo - 2008

Condição	idade					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
	(antes da ingestão de colostro/leite) (n = 5)	(até 48 hs. p.n.) (n = 5)	(48 - 96 hs. p.n.) (n = 5)	(96 - 144 hs. p.n.) (n = 5)	(144-192 hs. p.n.) (n = 5)	(192-240 hs.p.n.) (n = 5)
célula	7,98±1,3 A ¹	7,00±0,8 A	8,59±1,2 A	7,51±1,3 A	7,83±1,4 A	8,91±3,7 A
célula + <i>S. aureus</i>	15,58±3,4 A	46,80±22,5 A	75,88±37,4 B,C	82,29±35,0 B	49,83±20,4 A,B	27,92±21,4 A,C
célula + <i>E. coli</i>	18,87±2,2 A	25,84±6,5 A	29,00±9,1 A	32,66±8,4 A	28,71±14,9 A	29,74±8,9 A

¹valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativos (p<0,05)

Tabela 8 - Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da intensidade de fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela *S.aureus* marcada pelo iodeto de propídeo e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 2,0 litros de colostro - São Paulo – 2008

Idade	cel+ <i>S.aureus</i>	% de fagocitose
t0 (n = 5)	15,58±3,4 a ¹	45,44±11,3 a
t1 (n = 5)	46,80±22,5 a	75,78±23,3 b
t2 (n = 5)	75,88±37,4 b,c	91,84±10,6 b
t3 (n = 5)	82,29±35,0 b	97,39±4,2 b
t4 (n = 5)	49,83±20,4 a,b	94,15±7,3 b
t5 (n = 5)	27,92±21,4 a,c	74,01±16,3 b

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativos (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 22 - Atividade fagocítica, medida pela intensidade de fluorescência para *S. aureus* marcado com PI, de PMNs de bezerros que ingeriram 2,0 litros de colostro e a evolução da idade - São Paulo – 2008

Figura 23 - Percentual de fagocitose de PMNs do sangue de bezerros neonatos para *S. aureus*, antes (t0) e após a ingestão de 2,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Tabela 9 - Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela *E. coli* marcada por Alexa Fluor 594 e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam 2,0 litros de colostro - São Paulo - 2008

Idade	cel+ <i>E coli</i>	% de fagocitose
t0 (n = 5)	18,87±2,2 a ¹	14,89±7,8 a
t1 (n = 5)	25,84±6,5 a	17,05±11,2 a
t2 (n = 5)	29,00±9,1 a	51,39±13,6 a
t3 (n = 5)	32,66±8,4 a	51,67±31,2 a
t4 (n = 5)	28,71±14,9 a	25,77±5,9 a
t5 (n = 5)	29,74±8,9 a	30,31±10,5 a

¹valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativos (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 24 - Fagocitose de leucócitos PMNs para *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594, de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 25 - Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para *E. coli*, antes (t0) e após a ingestão de 2,0 litros de colostro (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

5.1.3 Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 3

Serão apresentados os resultados referentes à atividade funcional de bezerros que mamaram somente leite após o nascimento.

5.1.3.1 Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

O metabolismo oxidativo basal e estimulado de PMN do sangue de bezerros, que não ingeriram colostro ao nascer, não diferiram com a idade (Tabela 10 e Figuras 26-29).

A comparação do metabolismo basal e induzido utilizando como estímulos a bactéria *S. aureus* e o PMA, foram maiores após a estimulação em todas as idades. Em relação a *E. coli*, pode-se observar uma indução significativa do metabolismo oxidativo após t3 (Figuras 30-32).

Tabela 10 - Valores das médias geométricas e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência obtida na análise do metabolismo oxidativo espontâneo (basal) (DCFH-DA) e estimulado pela *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) marcado com Iodeto de propídeo (PI) (DCFH + *S. aureus*), *Escherichia coli* (cepa K12), marcada com Alexa Fluor 594 (DCFH + *E. coli*) e 12 - Miristato 13-acetato de forbol (PMA) de PMN do sangue de bezerros, "in vitro", que receberam somente leite ao nascer, segundo a idade - São Paulo - 2008

Condição	idade					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
	(antes da ingestão de colostro/leite) (n = 5)	(até 48 hs. p.n.) (n = 5)	(48 - 96 hs. p.n.) (n = 5)	(96 - 144 hs. p.n.) (n = 5)	(144-192 hs. p.n.) (n = 5)	(192-240 hs.p.n.) (n = 5)
DCFH - DA	22,47±3,5 A ¹	22,56±3,6 A	29,35±2,4 A	29,42±5,7 A	23,84±6,3 A	22,53±7,0 A
DCFH + <i>S. aureus</i>	32,37±8,6 A	43,24±13,7 A	73,40±30,1 A	70,79±31,5 A	61,51±24,5 A	60,86±24,2 A
DCFH + <i>E. coli</i>	22,77±3,2 A	24,59±1,5 A	32,29±6,5 A	33,50±5,1 A	28,10±7,3 A	28,88±9,6 A
DCFH + PMA	375,07±152,0 A	317,66±189,4 A	443,09±280,7 A	533,85±122,5 A	559,29±174,7 A	481,95±144,6 A

¹letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados com diferenças significativas (p<0,05)

Figura 26 - Produção espontânea de H_2O_2 , medida pela média geométrica da intensidade de fluorescência de PMNs do sangue de bezerros neonatos que ingeriram somente leite, segundo a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 27 - Metabolismo oxidativo de PMNs do sangue, de bezerros que ingeriram somente leite ao nascimento, incubados com *S. aureus* marcado com PI e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 28 - Valor médio e desvios-padrão da intensidade de fluorescência de PMNs do sangue de bezerros do Grupo 3 (que ingeriram somente leite), incubados com DCFH e *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594 e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 29 - Produção de H_2O_2 por PMNs do sangue de bezerros neonatos, que ingeriram somente leite ao nascimento, estimulada por PMA e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 30 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com *S. aureus* marcado com PI (DCFH + *S. aureus*), de animais que ingeriram somente leite segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

Figura 31 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com *E. coli* marcada com Alexa Flúor 594 (DCFH + *E. coli*), de animais que ingeriram somente leite segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

Figura 32 - Os dados representam a média e d. p. do metabolismo oxidativo basal (DCFH) e estimulado com PMA (DCFH + PMA), de animais que ingeriram somente leite segundo a idade - São Paulo – 2008 (* $p < 0,05$ em relação ao metabolismo oxidativo basal)

5.1.3.2 Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

Os resultados da avaliação da intensidade e do percentual de fagocitose, induzido pelas bactérias: *S. aureus* e *E. coli*, não diferiram para os animais que não ingeriram colostro ao nascer (Tabelas 11-13 e Figuras 33-36).

Tabela 11 - Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", não estimulados (célula) e estimulados pela *S.aureus* marcada pelo iodeto de propídeo e pela *E. coli* marcada com Alexa Fluor, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam leite - São Paulo - 2008

Condição	idade					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
	(antes da ingestão de colostro/leite) (n = 5)	(até 48 hs. p.n.) (n = 5)	(48 - 96 hs. p.n.) (n = 5)	(96 - 144 hs. p.n.) (n = 5)	(144-192 hs. p.n.) (n = 5)	(192-240 hs.p.n.) (n = 5)
célula	5,61±1,4 A ¹	7,85±4,0 A	6,41±3,9 A	6,90±5,4 A	8,67±8,8 A	7,58±5,8 A
+ <i>S. aureus</i>	30,37±19,9 A	38,29±22,1 A	73,84±66,3 A	56,00±42,7 A	50,21±26,6 A	49,79±32,2 A
+ <i>E. coli</i>	14,53±5,1 A	18,99±5,9 A	20,56±6,8 A	23,33±14,3 A	21,32±14,7 A	21,57±13,9 A

¹letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativos (p<0,05)

Tabela 12 - Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela *S.aureus* marcada pelo iodeto de propídeo e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam leite ao nascer - São Paulo - 2008

Idade	cel+ <i>S.aureus</i>	% de fagocitose
t0 (n = 5)	30,37±19,9 a ¹	61,65±27,3 a
t1 (n = 5)	38,29±22,1 a	74,65±32,9 a
t2 (n = 5)	73,84±66,3 a	83,22±18,2 a
t3 (n = 5)	56,00±42,7 a	89,02±2,6 a
t4 (n = 5)	50,21±26,6 a	85,81±13,6 a
t5 (n = 5)	49,79±32,2 a	85,26±6,5 a

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, resultados significativos ($p < 0,05$)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1 (até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 33 - Atividade fagocítica, medida pela intensidade de fluorescência, de PMN de bezerros para *S. aureus* marcado com PI que ingeriram somente leite e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Figura 34 - Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para *S. aureus*, antes (t0) e após a ingestão de leite (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Tabela 13 - Valores das médias geométricas e desvios-padrão (d.p.) da fagocitose medida pela intensidade média de fluorescência de PMN, "in vitro", estimulados pela *E. coli* marcada por Alexa Fluor 594 e o percentual de fagocitose, segundo a idade de bezerros neonatos, que receberam leite ao nascer - São Paulo - 2008

Idade	cel+ <i>E coli</i>	% de fagocitose
t0 (n = 5)	14,53±5,1 a ¹	20,46±8,0 a
t1 (n = 5)	18,99±5,9 a	42,59±25,3 a
t2 (n = 5)	20,56±6,8 a	54,33±24,7 a
t3 (n = 5)	23,33±14,3 a	53,79±21,0 a
t4 (n = 5)	21,32±14,7 a	48,34±24,0 a
t5 (n = 5)	21,57±13,9 a	52,39±20,4 a

¹valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, resultados significativos (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 35 - Fagocitose de leucócitos PMN de bezerros neonatos para *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594, que ingeriram leite e a idade - São Paulo - 2008

Figura 36 - Percentual de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos para *E. coli*, antes (t0) e após a ingestão de leite (t1 a t5) e a evolução da idade - São Paulo – 2008

5.2 Avaliação comparativa da atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos amamentados com quatro (G1) e dois litros de colostro (G2) e quatro litros de leite (G3)

Neste item serão apresentados os resultados comparando-se os grupos de animais que ingeriram respectivamente quatro litros de colostro (G1), dois litros de colostro (G2) e quatro litros de leite (G3). Primeiramente os resultados relacionados ao metabolismo oxidativo de leucócitos PMNs e na sequência aqueles referentes à atividade de fagocitose de G1, G2 e G3.

5.2.1 Avaliação do metabolismo oxidativo de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

– Comparação entre os grupos G1 e G2 e G3

A análise comparativa da atividade funcional dos polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos, relacionada ao volume de colostro ingerido após o tempo t0, mostrou que o metabolismo basal destas células foi menor no tempo t3 para os animais que ingeriram 4,0 litros de colostro, em comparação com os animais que não foram alimentados com colostro (grupo 3) (Tabela 14, Figura 37). Os leucócitos PMN dos animais que mamaram 4,0 litros de colostro apresentaram uma maior atividade de fagocitose para *S. aureus* quando comparados com aquela do grupo 3 e para *E. coli* (na comparação daquela às células dos grupos 2 e 3), no momento t1 (Tabelas 15 e 16, Figuras 38-39). Os menores valores de intensidade fluorescência do PMA ocorreram para o grupo 1 (t3) sendo significativo frente aos grupos 2 e 3 (Tabela 17, Figura 40).

Tabela 14 - Metabolismo oxidativo basal de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e de leite (Grupo 3) e a idade - São Paulo - 2008

idade	Grupo 1	DCFH Grupo 2	Grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	16,60±4,7 A ¹	22,29±2,3 A	22,47±3,5 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	30,93±8,9 A	24,45±5,3 A	22,56±3,6 A
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	27,33±14,9 A	26,98±3,4 A	29,35±2,4 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	20,88±3,8 A	25,85±5,4 A,C	29,42±5,7 B,C
t4 (144-192 hs. p.n.)	20,08±4,1 A	22,38±5,4 A	23,84±6,3 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	20,62±7,5 A	25,22±8,6 A	22,53±7,0 A

¹valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativos (p<0,05)

Figura 37 - Metabolismo oxidativo basal de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Tabela 15 - Metabolismo oxidativo de PMN do sangue s de bezerros neonatos, induzido pela *S. aureus*, antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 litros (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e de leite (Grupo3) e a idade - São Paulo - 2008

idade	DCFH + <i>S. aureus</i>		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	40,49±6,4 A ¹	37,11±3,4 A	32,37±8,6 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	188,23±78,4 A	102,90±68,4 A,C	43,24±13,7 B,C
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	215,36±84,8 A	189,81±120,2 A	73,40±30,1 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	162,60±29,6 A	193,24±123,2 A	70,79±31,5 A
t4 (144-192 hs. p.n.)	96,54±49,5 A	50,34±29,4 A	61,51±24,5 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	97,03±45,7 A	52,58±28,3 A	60,86±24,2 A

¹valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 38 - Metabolismo oxidativo de PMN do sangue s de bezerros neonatos, induzido pela *S. aureus*, antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Tabela 16 - Metabolismo oxidativo estimulado pela *E. coli* de PMN de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e de leite (Grupo3), segundo a idade - São Paulo - 2008

idade	Grupo 1	DCFH + <i>E. coli</i> Grupo 2	Grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	17,78±9,2 A ¹	24,39±3,3 A	22,77±3,2 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	42,73±9,9 A	28,26±5,3 B	24,59±1,5 B
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	43,12±21,2 A	38,23±7,4 A	32,29±6,5 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	31,25±7,7 A	35,71±8,4 A	33,50±5,1 A
t4 (144-192 hs. p.n.)	32,54±7,8 A	27,57±4,7 A	28,10±7,3 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	28,26±12,2 A	28,86±10,0 A	28,88±9,6 A

¹ valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 39 - Metabolismo oxidativo estimulado pela *E. coli* de PMN de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

Tabela 17 - Metabolismo oxidativo estimulado com PMA, de PMN do sangue de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3), segundo a idade - São Paulo - 2008

idade	Grupo 1	DCFH + PMA grupo 2	grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	240,55±153,0 A ¹	329,47±42,4 A	375,07±152,0 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	238,27±184,0 A	290,65±113,9 A	317,66±189,4 A
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	390,93±195,0 A	490,41±182,6 A	443,09±280,7 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	224,32±75,3 A	584,84±251,3 B	533,85±122,5 B
t4 (144-192 hs. p.n.)	301,53±141,0 A	535,16±242,4 A	559,29±174,7 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	234,58±103,0 A	502,48±247,8 A	481,95±144,6 A

¹ valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 40 - Metabolismo oxidativo estimulado com PMA, de PMN do sangue de bezerros neonatos antes (t0) e após (t1 a t5) a ingestão de 4,0 (Grupo 1) e 2,0 litros (Grupo 2) de colostro e leite (Grupo3) - São Paulo - 2008

5.2.2 Avaliação da atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros neonatos "in vitro"

- Estudo comparativo entre os grupos G1 e G2 e G3

O estudo comparativo entre os animais que receberam 4,0, 2,0 litros de colostro e somente leite, após o tempo t0, e a atividade de fagocitose para *S. aureus*, mostrou que a intensidade de fluorescência foi maior no tempo t4 de animais que mamaram 4,0 litros de colostro (Tabela 18 e Figura 41). O percentual de fagocitose não diferiu entre os grupos nos tempos t0, t1, t2 e t4. Entretanto, esta porcentagem foi menor no tempo t3 para os animais que não mamaram colostro, e no tempo t5, para os que mamaram 2,0 litros de colostro em relação àqueles que mamaram 4,0 litros de colostro ao nascer (Tabela 19 e Figuras 42).

Considerando a fagocitose para *E. coli* as maiores diferenças ocorreram antes da ingestão de colostro (t0) para os animais do grupo1 quando comparados aos do grupo 3 (Tabela 20 e Figura 43). O percentual de células que fagocitaram a bactéria foi menor no

tempo 2 para os animais 2,0 litros de colostro quando comparados com os animais do grupo 1 (Tabela 21, Figura 44).

Tabela 18 - Valores médios da intensidade de fluorescência de PMNs do sangue de bezerros e a atividade de fagocitose para *S. aureus*, segundo o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) e a idade - São Paulo - 2008

idade	Grupo 1	<i>S. aureus</i> Grupo 2	Grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	17,70±6,9 A ¹	15,58±3,4 A	30,37±19,9 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	77,33±30,0 A	46,80±22,5 A	38,29±22,1 A
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	78,41±41,3 A	75,88±37,4 A	73,84±66,3 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	62,49±26,5 A	82,29±35,0 A	56,00±42,7 A
t4 (144-192 hs. p.n.)	84,68±10,5 A	49,83±20,4 B	50,21±26,6 B
t5 (192-240 hs.p.n.)	53,29±19,2 A	27,92±21,4 A	49,79±32,2 A

¹valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 41 - Atividade de fagocitose medida pela média e d.p. da intensidade de fluorescência de PMN de bezerras para *S. aureus*, segundo o volume de colostro fornecido (quatro litros - Grupo 1, dois litros - Grupo 2) e somente leite (Grupo 3), e a idade - São Paulo, 2008.

Tabela 19 - Percentual de fagocitose para a *S. aureus* de PMN do sangue de bezerras, segundo a idade e o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo - 2008

idade	percentual de fagocitose para <i>S. aureus</i>		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	63,50±25,0 A ¹	45,44±11,3 A	61,65±27,3 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	93,29±14,1 A	75,78±23,3 A	74,65±32,9 A
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	98,23±2,7 A	91,84±10,6 A	83,22±18,2 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	98,80±1,3 A	97,39±4,2 A	89,02±2,6 B
t4 (144-192 hs. p.n.)	99,47±0,3 A	94,15±7,3 A	85,81±13,6 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	96,10±5,5 A	74,01±16,3 B	85,26±6,5 A,B

¹ valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 42 - Percentual de fagocitose de PMN do sangue para a *S. aureus*, segundo a quantidade de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo - 2008

Tabela 20 - Valores médios da intensidade de fluorescência de PMN do sangue de bezerros e a atividade de fagocitose para *E. coli*, segundo o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) e a idade - São Paulo - 2008

idade	Grupo 1	<i>E. coli</i> Grupo 2	Grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	28,64±11,1 A ¹	18,87±2,2 A,C	14,53±5,1 B,C
t1 (até 48 hs. p.n.)	28,83±9,3 A	25,84±6,5 A	18,99±5,9 A
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	24,46±9,0 A	29,00±9,1 A	20,56±6,8 A
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	26,58±5,6 A	32,66±8,4 A	23,33±14,3 A
t4 (144-192 hs. p.n.)	28,68±8,0 A	28,71±14,9 A	21,32±14,7 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	34,83±8,0 A	29,74±8,9 A	21,57±13,9 A

¹valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 43 - Atividade de fagocitose de PMN do sangue de bezerros para *E. coli*, segundo a idade e a quantidade de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo - 2008

Tabela 21 - Percentual de fagocitose para a *E. coli* de PMN do sangue de bezerros, segundo a idade e o volume de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) - São Paulo - 2008

idade	percentual de fagocitose para <i>E. coli</i>		
	Grupo 1	grupo 2	grupo 3
t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	45,37±30,3 A ¹	14,89±7,8 A	20,46±8,0 A
t1 (até 48 hs. p.n.)	56,89±24,1 A	17,05±11,2 A	42,59±25,3 A
t2 (48 - 96 hs. p.n.)	55,25±14,6 A	51,39±13,6 B,C	54,33±24,7 A,C
t3 (96 - 144 hs. p.n.)	57,86±15,1 A	51,67±31,2 A	53,79±21,0 A
t4 (144-192 hs. p.n.)	37,61±17,4 A	25,77±5,9 A	48,34±24,0 A
t5 (192-240 hs.p.n.)	38,19±9,5 A	30,31±10,5 A	52,39±20,4 A

¹ valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativos (p<0,05)

Figura 44 - Percentual de fagocitose de PMN do sangue para a *E. coli*, segundo a quantidade de colostro mamado (4,0 litros - G1; e 2,0 litros - G2) e somente leite (G3) e a evolução da idade - São Paulo - 2008

5.3 Exames complementares

Descrevem-se a seguir os resultados referentes ao leucograma, proteinograma e atividade de Gamaglutamiltransferase e da determinação das imunoglobulinas M, G e G1 do sangue de bezerros neonatos “in vitro”, tratados com diferentes volumes de colostro.

5.3.1 Leucograma

A Tabela 22 mostra os valores médios e desvios-padrão de leucócitos de bezerros, nos primeiros 10 dias de vida (t_0 a t_5), segundo os grupos de animais: grupo1 (que receberam 4,0 litros de colostro), do grupo 2 (que ingeriram 2,0 litros de colostro) e grupo3, que receberam somente leite após o nascimento.

A seguir, destacam-se os resultados do número total de leucócitos do sangue, para cada um dos grupos estudados, segundo a idade dos animais e as diferenças que foram observadas entre os grupos (Tabela 23 e Figura 45). Os resultados referentes aos valores de leucócitos polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e a quantidade de colostro ingerida, estão na tabela 24 e figura 46.

Tabela 22 - Valores médios absolutos e desvios-padrão dos componentes do leucograma de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado (quatro litros - grupo1, dois litros - grupo2), e somente leite (grupo 3) - São Paulo - 2008

	Grupo	t0 (antes da ingestão de colostro/leite)	t1 (até 48 hs. p.n.)	t2 (48 - 96 hs. p.n.)	t3 (96 - 144 hs. p.n.)	t4 (144-192 hs. p.n.)	t5 (192-240 hs.p.n.)
Leucócitos x 10 ³ /μl	1 (n=5)	11,44±4,1 a ¹	6,78±3,06 a	7,12±1,94 a	8,28±3,68 a	9,16±4,26 a	9,42±4,31 a
	2 (n=5)	10,60±4,1 a	10,52±3,4 a	8,68±1,5 a	10,54±2,5 a	11,70±3,6 a	11,34±3,4 a
	3 (n=5)	10,02±2,0 a	10,12±1,8 a	8,56±2,2 a	9,70±2,2 a	13,08±4,4 a	11,54±5,4 a
Basófilos x 10 ³ /μl	1 (n=5)	0,00±0,0 a	0,00±0,0 a	0,02±0,0 a	0,00±0,0 a	0,00±0,0 a	0,02±0,0 a
	2 (n=5)	0,00±0,0 a	0,00±0,0 a	0,08±0,1 a	0,04±0,1 a	0,00±0,0 a	0,00±0,0 a
	3 (n=5)	0,00±0,0 a	0,02±0,0 a	0,01±0,0 a	0,00±0,0 a	0,02±0,0 a	0,00±0,0 a
Eosinófilos x 10 ³ /μl	1 (n=5)	0,00±0,0 a	0,01±0,0 a	0,02±0,0 a	0,05±0,1 a	0,01±0,0 a	0,00±0,0 a
	2 (n=5)	0,29±0,3 a	0,05±0,1 a	0,07±0,1 a	0,06±0,1 a	0,00±0,0 a	0,00±0,0 a
	3 (n=5)	0,02±0,0 a	0,02±0,1 a	0,00±0,0 a	0,00±0,0 a	0,06±0,1 a	0,02±0,0 a
Neutrófilos x 10 ³ /μl	1 (n=5)	7,53±2,8 a	4,19±2,4 a	3,89±1,2 a	4,72±2,5 a	5,06±2,6 a	5,22±2,5 a
	2 (n=5)	5,74±3,2 a	5,66±2,0 a	4,21±0,6 a	5,37±1,2 a	5,49±2,5 a	6,60±2,5 a
	3 (n=5)	6,10±1,7 a	6,87±1,8 a	4,75±1,5 a	5,63±1,8 a	7,92±3,9 a	6,19±4,7 a
Linfócitos x 10 ³ /μl	1 (n=5)	2,92±1,2 a	1,97±0,6 a	2,53±0,8 a	2,57±1,0 a	3,31±1,8 a	3,20±1,5 a
	2 (n=5)	2,94±1,1 a	3,95±1,5 b	3,61±1,1 a	3,88±1,6 a	5,11±2,2 a	4,18±1,1 a
	3 (n=5)	3,53±1,7 a	2,66±0,8 ab	2,89±0,9 a	2,82±0,9 a	3,83±0,6 a	4,01±1,0 a
Monócitos x 10 ³ /μl	1 (n=5)	0,99±0,6 a	0,62±0,4 a	0,66±0,3 a	0,95±0,5 a	0,78±0,4 a	0,98±0,5 a
	2 (n=5)	0,89±0,5 a	0,85±0,4 a	0,71±0,4 a	1,19±0,4 a	1,11±0,3 a	0,66±0,2 a
	3 (n=5)	0,37±0,3 a	0,53±0,5 a	0,91±0,3 a	1,25±0,5 a	1,22±0,6 a	1,32±0,7 a

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados com diferenças significativas (p<0,05)

5.3.1.1 Avaliação do número total de leucócitos do sangue de bezerros neonatos

Os resultados referentes ao número total de leucócitos do sangue de bezerros neonatos revelaram que não houve diferenças relacionadas à idade em nenhum dos grupos experimentais. A comparação das médias dos resultados dos grupos 1, 2 e 3 em cada uma das faixas etárias não qualquer diferença (Tabela 23, Figura 45).

Tabela 23 - Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos totais do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado; quatro litros (grupo1) e dois litros (grupo2) ou leite (grupo 3) - São Paulo - 2008

Leucócitos totais x 10 ³ /μl de sangue			
IDADE	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
t0	11,44±4,10 ^{aA1}	10,6±4,11 ^{aA}	10,02±2,0 ^{aA}
t1	6,78±3,06 ^{aA}	10,5±3,4 ^{aA}	10,12±1,8 ^{aA}
t2	7,12±1,94 ^{aA}	8,7±1,5 ^{aA}	8,56±2,2 ^{aA}
t3	8,28±3,68 ^{aA}	10,5±2,5 ^{aA}	9,70±2,2 ^{aA}
t4	9,16±4,26 ^{aA}	11,7±3,6 ^{aA}	13,08±4,4 ^{aA}
t5	9,42±4,31 ^{aA}	11,3±3,4 ^{aA}	11,54±5,4 ^{aA}

1 valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 45 - Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado: (quatro litros - grupo1 e dois litros -grupo2) ou somente leite (grupo 3) - São Paulo - 2008

5.3.1.2 Avaliação do número de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos

A tabela 24 e a figura 46, mostram os valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos polimorfonucleares de bezerros neonatos segundo a idade e a quantidade de colostro ou somente leite ingerida (grupo 1, grupo 2 e grupo 3). Pode-se notar que não houve diferenças do número destas células, nas diferentes faixas etárias em nenhum dos grupos estudados. A análise intragrupal também não revelou diferenças.

Tabela 24 - Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e a quantidade de colostro mamado: quatro litros (grupo1) e dois litros (grupo2) ou somente leite (grupo3) - São Paulo - 2008

Polimorfonucleares x 10 ³ /μl de sangue			
IDADE	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
t0	7,53±2,8 ^{aA}	6,04±3,4 ^{aA}	6,12±1,7 ^{aA}
t1	4,20±2,3 ^{aA}	5,71±2,0 ^{aA}	6,91±1,8 ^{aA}
t2	3,93±1,2 ^{aA}	4,36±0,6 ^{aA}	4,76±1,5 ^{aA}
t3	4,76±2,6 ^{aA}	5,47±1,1 ^{aA}	5,63±1,8 ^{aA}
t4	5,07±2,6 ^{aA}	5,49±2,5 ^{aA}	8,01±4,0 ^{aA}
t5	5,24±2,5 ^{aA}	6,60±2,5 ^{aA}	6,21±4,7 ^{aA}

valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, resultados significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha, resultados significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1 (até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 46 - Valores médios e respectivos desvios-padrão de leucócitos polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos segundo a idade e o volume de colostro mamado: quatro litros (grupo1) e dois litros (grupo2) e somente leite (grupo 3) - São Paulo - 2008

5.3.2 Proteinograma e atividade sérica da Gamaglutamiltransferase

Inicialmente são apresentados os resultados médios e desvios padrão dos componentes do proteinograma e da atividade sérica da Gamaglutamiltransferase, de cada um dos grupos experimentais (Tabelas 25, 26 e 27) e na seqüência a comparação entre os grupos para cada uma das determinações (Tabelas 28 a 33 e Figuras de 47 a 52).

Os valores séricos da Proteína total, dos animais pertencentes aos grupos que ingeriram colostro (grupo 1 e 2), foram menores antes da ingestão de colostro, do que nos outros tempos de estudo. Os animais que não receberam colostro não apresentaram diferenças nos valores séricos de proteína total em função da evolução da idade (Tabela 28). A comparação entre os grupos G1, G2 e G3, em cada um dos tempos, revela que o valor médio de proteínas séricas totais foi menor para os animais do grupo 3, após o tempo t0, em relação àqueles animais dos grupos que ingeriram colostro (Figura 47).

Os resultados do fracionamento eletroforético para a albumina e frações globulínicas encontram-se nas tabelas 29 a 32. Os valores médios de albumina não diferiram em função da idade dos animais em nenhum dos grupos experimentais (Tabela 29). A comparação dos teores de albumina sérica entre os animais do tempo t5 (9 a 10 dias de vida) mostrou diferenças entre os três grupos com menor valor para o grupo 3 (Figura 48).

Considerando a fração alfa globulina, pode-se observar a mesma tendência da albumina, ou seja, não houve diferenças entre os tempos dentro de cada um dos grupos experimentais (Tabela 30). Todavia, a comparação intragrupal mostrou que, exceto no momento t4, os animais que receberam somente leite apresentaram valores médios de alfa globulina superiores aos dos animais que ingeriram colostro (Figura 49).

A análise dos resultados da fração beta globulina (Tabela 31) mostra que no tempo t0 foram encontrados os menores valores tanto para os animais do grupo 1 quanto para os do

grupo2. No grupo 1, os valores foram maiores que o do tempo t0 em todos os momentos exceto para o t4. No grupo 2, os valores médios da fração betaglobulina sérica aumentaram de forma significativa em relação a t0, a partir de t2 e se mantiveram nos animais das demais faixas etárias (t3 at5). Para os animais do grupo que não recebeu colostro, os valores se mantiveram até t3, ocorrendo então o maior valor da betaglobulina tempo t4, ou seja, de 144 horas até 192 horas p.n. Comparando-se os grupos pode-se verificar que os valores do grupo 2 foram superiores aos valores do grupo 3 em todos os tempos do estudo. O mesmo ocorreu com o grupo1, exceto para os tempos t0 e t4, quando foram observados resultados semelhantes (Figura 50).

Analisando a fração gamaglobulina (Tabela 32), foi notado que os menores valores encontrados entre os animais do grupo 1, ocorreram no tempo t0, ou seja, antes da mamada do colostro. O mesmo fato se repetiu no grupo 2, porém neste grupo, no tempo t5, ocorreu uma diminuição da fração gamaglobulina, quando comparada ao tempo t1. Os valores séricos da gamaglobulina permaneceram baixos e estáveis para os animais do grupo 3. Os resultados da comparação entre os grupos, nos diferentes tempos do estudo, mostraram que os valores desta fração protéica diferiram nos três grupos antes da ingestão de colostro ou leite (t0). Contudo, com o passar do tempo, os valores se elevaram nos grupos 1 e 2, permanecendo menores no grupo que só recebeu leite (Figura 51).

Finalmente, os valores da GGT dos animais do grupo G1 foram menores antes da mamada do colostro, tendo apresentado um aumento significativo em t1, que se manteve em t2 e t3 e diminuiu com o passar do tempo. Resultados semelhantes foram observados no grupo 2, tendo os animais apresentado um valor máximo de GGT no tempo t1, o qual diminuiu como passar do tempo. Para os animais do grupo 3, os valores de GGT se mantiveram baixos durante todo o período do estudo. A comparação intragrupal em função do tempo, mostrou as

diferenças entre os animais do grupo 3 em relação aos grupos 1 e 2 em todos os momentos após o tempo t_0 (Tabela 33 e Figura 52).

Tabela 25 - Valores médios e respectivos desvios-padrão dos valores séricos de proteína total (g/dl), albumina (g/dl) e frações alfa, beta e gamaglobulinas (g/dl) e da atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase, segundo a idade, de animais que receberam 4,0 litros de colostro ao nascer (grupo 1) - São Paulo - 2008

Determinações	idade					
	t0 (n = 5)	t1 (n = 5)	t2 (n = 5)	t3 (n = 5)	t4 (n = 5)	t5 (n = 5)
Proteína sérica total (g/dl)	4,74±0,4	7,04±0,9	6,85±0,9	7,52±0,6	6,90±0,8	6,26±0,7
Albumina Sérica (g/dl)	2,74±0,3	2,78±0,3	2,66±0,2	2,97±0,3	2,83±0,3	2,53±0,1
Alfaglobulina (g/dl)	0,73±0,2	0,80±0,3	0,84±0,05	1,00±0,2	0,94±0,3	0,81±0,1
Betaglobulina (g/dl)	0,68±0,2	1,12±0,3	1,09±0,2	1,26±0,2	1,05±0,2	1,09±0,1
Gamaglobulina (g/dl)	0,60±0,1	2,35±0,5	2,26±0,5	2,29±0,4	2,07±0,4	1,83±0,5
Gamaglutamiltransferase (UI/l)	6,31±2,0	630,28±273,2	393,31±245,8	316,26±165,9	222,83±141,5	166,78±75,1

Tabela 26 - Valores médios e respectivos desvios-padrão dos valores séricos de proteína total (g/dl), albumina (g/dl) e frações alfa, beta e gamaglobulinas (g/dl) e atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase, segundo a idade, de animais que receberam 2,0 litros de colostro ao nascer (grupo 2) - São Paulo - 2008

Determinações	idade					
	t0 (n = 5)	t1 (n = 5)	t2 (n = 5)	t3 (n = 5)	t4 (n = 5)	t5 (n = 5)
Proteína sérica total (g/dl)	5,04±0,1	7,13±0,4	7,09±0,3	6,95±0,2	6,99±0,2	7,02±0,2
Albumina Sérica (g/dl)	2,65±0,1	2,72±0,4	2,66±0,4	2,74±0,1	2,83±0,3	2,89±0,2
Alfaglobulina (g/dl)	0,73±0,1	0,94±0,2	0,98±0,2	0,86±0,2	0,99±0,2	1,05±0,1
Betaglobulina (g/dl)	0,83±0,2	1,09±0,1	1,24±0,1	1,17±0,1	1,23±0,2	1,21±0,1
Gamaglobulina (g/dl)	0,83±0,2	2,38±0,4	2,21±0,2	2,18±0,2	1,95±0,2	1,87±0,2
Gamaglutamiltransferase (UI/l)	7,41±2,2	624,90±70,9	291,08±114,1	197,03±54,3	151,69±55,4	122,75±49,5

Tabela 27 - Valores médios e respectivos desvios-padrão dos valores séricos de proteína total (g/dl), albumina (g/dl) e frações alfa, beta e gamaglobulinas (g/dl) e atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase, segundo a idade, de animais que receberam somente leite ao nascer (grupo 3) - São Paulo - 2008

Determinações	idade					
	t0 (n = 5)	t1 (n = 5)	t2 (n = 5)	t3 (n = 5)	t4 (n = 5)	t5 (n = 5)
Proteína sérica total (g/dl)	4,17±0,8	4,31±1,0	4,15±0,8	4,98±1,0	4,71±0,9	4,58±0,9
Albumina Sérica (g/dl)	2,31±0,4	2,36±0,4	2,32±0,4	2,59±0,5	2,36±0,4	2,22±0,2
Alfaglobulina (g/dl)	1,32±0,1	1,37±0,2	1,28±0,1	1,42±0,1	1,37±0,6	1,55±0,3
Betaglobulina (g/dl)	0,56±0,1	0,56±0,1	0,56±0,1	0,69±0,1	0,80±0,1	0,75±0,1
Gamaglobulina (g/dl)	0,30±0,1	0,35±0,1	0,30±0,1	0,62±0,4	0,58±0,2	0,44±0,1
Gamaglutamiltransferase (UI/l)	4,59±1,6	22,08±17,8	8,62±3,7	10,26±2,7	9,80±1,9	9,97±1,4

Tabela 28 - Valores médios e respectivos desvios-padrão de proteína total, observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro e , Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008

Grupo	Proteína sérica total (g/dl)					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
1 (n=5)	4,74±0,4 aA ¹	7,04±0,9 aB	6,85±0,9 aB	7,52±0,6 aB	6,90±0,8 aB	6,26±0,7 aB
2 (n=5)	5,04±0,1 aA	7,13±0,4 aB	7,09±0,3 aB	6,95±0,2 aB	6,99±0,2 aB	7,02±0,2 aB
3 (n=5)	4,17±0,8 aA	4,31±1,0 bA	4,15±0,8 bA	4,98±1,0 bA	4,71±0,9 aA	4,58±0,9 bA

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 47 - Variação dos valores médios de proteína sérica total (g/dl) de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo - 2008

Tabela 29 - Valores médios e respectivos desvios-padrão de albumina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade os grupos experimentais (Grupo 1: 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008

Grupo	Albumina (g/dl)					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
1 (n=5)	2,74±0,3 aA ¹	2,78±0,3 aA	2,66±0,2 aA	2,97±0,3 aA	2,83±0,3 aA	2,53±0,1 aA
2 (n=5)	2,65±0,1 aA	2,72±0,4 aA	2,66±0,4 aA	2,74±0,1 aA	2,83±0,3 aA	2,89±0,2 bA
3 (n=5)	2,31±0,4 aA	2,36±0,4 aA	2,32±0,4 aA	2,59±0,5 aA	2,36±0,4 aA	2,22±0,2 cA

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 48- Variação dos valores médios de albumina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo - 2008

Tabela 30 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da fração alfa globulina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro e , Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008.

Grupo	fração alfa globulina (g/dl)					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
1 (n=5)	0,73±0,2 aA ¹	0,80±0,3 aA	0,84±0,05 aA	1,00±0,2 aA	0,94±0,3 aA	0,81±0,1 aA
2 (n=5)	0,73±0,1 aA	0,94±0,2 aA	0,98±0,2 aA	0,86±0,2 aA	0,99±0,4 aA	1,05±0,1 aA
3 (n=5)	1,32±0,1 bA	1,37±0,2 bA	1,28±0,1 bA	1,42±0,1 bA	1,37±0,6 aA	1,55±0,3 bA

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 49 - Variação dos valores médios da fração alfa globulina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo - 2008

Tabela 31 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da fração betaglobulina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008

Grupo	fração betaglobulina (g/dl)					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
1 (n=5)	0,68±0,2 acA ¹	1,12±0,3 aBC	1,09±0,2 aBC	1,26±0,2 aBC	1,05±0,2 acAC	1,09±0,1 aBC
2 (n=5)	0,83±0,2 aA	1,09±0,1 aAC	1,24±0,1 aBC	1,17±0,1 aBC	1,23±0,2 aBC	1,21±0,1 aBC
3 (n=5)	0,56±0,1 bcA	0,56±0,1 bA	0,56±0,1 bA	0,69±0,1 bAC	0,80±0,1 bcBC	0,75±0,1 bAC

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 50 - Variação dos valores médios da fração betaglobulina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo - 2008

Tabela 32 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da fração gamaglobulina (g/dl), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008

Grupo	fração gamaglobulina (g/dl)					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
1 (n=5)	0,60±0,1 aA	2,35±0,5aB	2,26±0,5 aB	2,29±0,4 aB	2,07±0,4 aB	1,83±0,5 aB
2 (n=5)	0,83±0,2 bA	2,38±0,4aB	2,21±0,2aBC	2,18±0,2aBC	1,95±0,2aBC	1,87±0,2aC
3 (n=5)	0,30±0,1 cA	0,35±0,1 bA	0,30±0,1 bA	0,62±0,4 bA	0,58±0,2 bA	0,44±0,1 bA

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativas ($p < 0,05$)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativas ($p < 0,05$)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 51 - Variação dos valores médios da fração gamaglobulina (g/dl) do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo - 2008

Tabela 33 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (UI/l), observados no sangue de bezerros segundo a idade e os grupos experimentais (Grupo 1 - 4,0 litros de colostro; Grupo 2: 2,0 litros de colostro; Grupo 3: leite) - São Paulo - 2008

gamaglutamiltransferase (UI/l)						
Grupo	t0	t1	t2	t3	t4	t5
1 (n=5)	6,31±2,0 aA	630,28±273,2 aB	393,31±245,8 aBC	316,26±165,9 aAB	222,83±141,5 aAC	166,78±75,1 aAC
2 (n=5)	7,41±2,2 aA	624,90±70,9 aB	291,08±114,1 aC	197,03±54,3 aCD	151,69±55,4 aD	122,75±49,5 aAD
3 (n=5)	4,59±1,6 aA	22,08±17,8 bA	8,62±3,7 bA	10,26±2,7 bA	9,80±1,9 bA	9,97±1,4 bA

¹ valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam resultados significativas (p<0,05)

valores com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados significativas (p<0,05)

t0 (antes da ingestão de colostro/leite); t1(até 48 hs. p.n.); t2 (48 - 96 hs. p.n.); t3 (96 - 144 hs. p.n.); t4 (144-192 hs. p.n.); t5 (192-240 hs.p.n.)

Figura 52 - Atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase do sangue de bezerros dos três grupos experimentais e nos diferentes tempos do estudo - São Paulo - 2008

5.3.3 Determinação das imunoglobulinas M, G e G₁ (IgM, IgG e IgG₁)

Nas figuras 53 a 55, são apresentados os valores das medianas das taxas séricas das imunoglobulinas IgM, IgG e IgG₁ e seus respectivos desvios-padrão. Conforme pode-se observar, antes da ingestão do colostro/leite (tempo zero) não houve diferenças nos valores da mediana das imunoglobulinas, que se mantiveram baixos nos três grupos. O diâmetro dos anéis das amostras no tempo zero e do tempo 2 dos animais do grupo 3, foram muito pequenos, fora dos limites da curva do teste utilizado. Portanto, não foi possível atribuir valores exatos a estas leituras, mas tão somente a indicação de que elas se situam abaixo do valor mínimo de leitura possível com este teste. Os valores de IgM, IgG e IgG₁, quando comparados em t₂ (entre 48 e 96 horas p. n) foram maiores nos grupos de bezerros que ingeriram colostro do que naquele tratado com leite.

Figura 53 - Valores da mediana da IgM sérica (mg/dl) no sangue de bezerros dos diferentes grupos experimentais, observados antes da mamada do colostro ou leite (t₀) e entre 48 e 96 horas p. n. (t₂) - São Paulo - 2008

Figura 54 - Variação dos valores da mediana da IgG sérica (mg/dl) no sangue de bezerros dos diferentes grupos experimentais, observados antes da mamada do colostro ou leite (t0) e entre 48 e 96 horas p. n. (t2) - São Paulo - 2008

Figura 55 - Valores da mediana da IgG₁ sérica (mg/dl) no sangue de bezerros dos diferentes grupos experimentais, observados antes da mamada do colostro ou leite (t0) e entre 48 e 96 horas p. n. (t2) - São Paulo - 2008

6 DISCUSSÃO

Muitos estudos foram realizados procurando avaliar a importância da ingestão do colostro pelos bezerros neonatos. Apesar das informações adquiridas nesses trabalhos, onde se destaca a necessidade do fornecimento de pelo menos 2,0 litros de colostro ao bezerro recém nascido nas primeiras seis horas de vida, as taxas de mortalidade e morbidade no primeiro mês de vida, associadas à diarreia, continuam elevadas nos rebanhos leiteiros brasileiros.

Embora, muitos criadores tenham dificuldade em estabelecer medidas sanitárias nos rebanhos, que minimizem estas perdas; optam pelo uso de vacinas e medicamentos, que acabam representando um custo muito mais elevado na produção leiteira, e nem sempre estão associados a menores taxas da doença.

Existem poucos estudos avaliando a defesa inata de leucócitos polimorfonucleares do sangue dos bezerros neonatos e o papel das opsoninas como anticorpos e fatores do complemento, principalmente no que se refere à *E. coli* enterotoxigênica (ECET), ainda não se encontra completamente estabelecidos.

Desta forma, neste trabalho procurou-se avaliar a função de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos, analisando a produção espontânea e provocada de peróxido de hidrogênio e a fagocitose em animais com até 10 dias de vida que receberam distintas quantidades de colostro ao nascimento.

O exame físico dos animais, através das funções vitais, exceto para o momento t0 (antes da mamada do colostro) que era realizada na propriedade de onde provinham os bezerros, foi efetuado em um galpão experimental, dentro das dependências do Setor Experimental de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do VCM do Hospital Veterinário da FMVZ – USP. Neste local foi possível manter os animais em gaiolas individuais e em condições bastante semelhantes no que se refere à temperatura ambiental e manejo.

Na avaliação da temperatura retal dos animais, apenas no grupo 2, os valores foram mais elevados no tempo t0, mantendo-se constante nos demais tempos do estudo. Para os animais dos grupos 1 e 2, não houve diferenças relacionadas a mudanças de temperatura corpórea nas diferentes faixas etárias. A comparação entre os grupos por idade, também não mostrou diferenças entre os valores obtidos para temperatura retal. O maior valor encontrado no grupo 2, antes da mamada do colostro, pode estar associado ao fato de que os animais, na propriedade em que nasceram, ficavam no pasto após o parto, muitas vezes expostos ao Sol, o que poderia determinar elevações térmicas.

O menor e maior valor de temperatura retal encontrados, independente do grupo, foram respectivamente (37,7°C ; 39,8°C). Este intervalo é maior do que o descrito na literatura (STÖBER, 1993; HOUSTON, RADOSTITIS, 2000; FEITOSA, 2004), onde a variação da temperatura em bezerros jovens está entre 38,5 - 39,5 graus Celsius. Os valores de temperatura, abaixo dos encontrados nos tratados de semiologia, podem estar relacionados a menor capacidade termorreguladora dos animais recém-nascidos, visto que estas ocorreram nos tempos t0 e t1 ou ainda, associadas a condições atmosféricas adversas, como clima frio e úmido, pois dois animais tiveram temperaturas abaixo do limite mínimos (37,7°C), registradas no final de junho¹. Os valores mais elevados da temperatura (39,8°C), foram encontrados em um animal do grupo que não recebeu colostro e apresentava diarreia, respiração ruidosa, tosse e corrimento nasal bilateral.

A frequência de movimentos respiratórios por minuto, considerando os animais do grupo 1, foi maior no tempo t2 (56,80±17,8), em relação a t5 (32,00±6,9). Para o grupo 2, os menores valores foram encontrados nos tempos t3 (24,80±5,2) e t4 (28,00±4,9), que foram significativas quando comparadas ao t0 (57,00±14,8). No grupo 3 não ocorreram diferenças entre valores médios da frequência de movimentos respiratórios por minuto e a evolução da

¹ 26/06/07 – Temperatura mínima de 14°C; média de 19°C e, máxima de 25°C. Umidade relativa do ar em 80%, Fonte: INMET, 2008

idade. Entre os grupos também não foram encontradas diferenças na frequência respiratória. Entretanto, os valores médios encontrados neste experimento, principalmente nos primeiros dias de vida foram superiores aos valores considerados fisiológicos nos compêndios de semiologia (STÖBER, 1993; HOUSTON, RADOSTITIS, 2000; FEITOSA, 2004). Resultados mais elevados da frequência respiratória também foram encontrados por Benesi (1992), em bezerros com até 72 horas de vida, e por Lisboa et al. (2003).

A frequência de batimentos cardíacos dos animais dos três grupos experimentais, apresentou-se mais elevada do que àquela encontrada como referência em obras de semiologia veterinária (STÖBER, 1993; HOUSTON, RADOSTITIS, 2000; FEITOSA, 2004). A idade não afetou os resultados dos grupos 1 e 3; entretanto, os animais do grupo 2 apresentaram uma diminuição da frequência cardíaca média em t4 ($117,20 \pm 16,7$) quando comparada a t0 ($176,00 \pm 23,0$). Entre os grupos não houve diferença. Estes resultados concordam com os de Benesi (1992) e Lisboa et al. (2003) que também encontraram valores mais elevados da frequência cardíaca em neonatos.

Embora o uso de antibiótico possa ter mascarado variações nas funções vitais dos animais do grupo 3, que não ingeriram colostro, esta decisão pareceu ser a mais apropriada, pois visava unicamente manter os animais nas melhores condições clínicas possíveis.

6.1 Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 1

O metabolismo oxidativo basal de animais que receberam 4,0 litros de colostro ao nascer, foi semelhante nas diferentes idades. Os resultados encontrados revelaram que a explosão respiratória não estimulada dos PMNs não foi afetada pela ingestão de colostro, ou

seja, as imunoglobulinas do colostro não exerceram influência sobre o metabolismo basal celular.

Azedo (2007), trabalhando com vacas com sorologia negativa e positiva para Leucose Enzoótica dos Bovinos também não observou diferenças na produção de peróxido de hidrogênio de leucócitos não estimulados, entre os animais negativos e os positivos sem linfocitose. Apenas os animais positivos com linfocitose persistente apresentaram uma menor atividade basal destas células. Sugerindo que os leucócitos que não estavam produzindo o peróxido de hidrogênio, eram representados por linfócitos, em sua maioria.

O aumento do metabolismo oxidativo basal de PMNs do sangue, foi verificado em vacas, após a indução experimental de infecção mamária por *E. coli*. Esta elevação poderia indicar uma resposta destas células à presença de mediadores da inflamação, como citocinas, liberadas durante a infecção (OOSTVELDT et al., 1999).

Desta forma, os resultados obtidos para o metabolismo basal, são concordantes com os achados dos autores retromencionados, que indicam que a liberação de peróxido de hidrogênio de PMNs do sangue não estimulado não se altera, a menos que hajam alterações orgânicas que possam levar a um estímulo ou inibição deste processo no organismo animal.

A indução da explosão respiratória, utilizando como estímulo a bactéria *S. aureus*, revelou um aumento da intensidade de fluorescência dos fagócitos PMNs após a ingestão de colostro e que se manteve elevada por 96 a 144 horas p.n. revelando uma influência positiva das imunoglobulinas colostrais, principalmente IgG, na opsonização da bactéria e indução da explosão respiratória, principalmente nos primeiros 6 dias de vida.

A *E. coli* também induziu de forma significativa o metabolismo oxidativo após a mamada do colostro, principalmente durante as primeiras 96 horas p.n.; após este período, a intensidade de fluorescência destas células apresentou uma leve diminuição.

Independentemente das diferenças estruturais e imunológicas que as bactérias utilizadas como estímulo apresentam, a ingestão de 4,0 litros de colostro exerceu uma influência positiva no desencadeamento da explosão respiratória pelos PMNs, nos primeiros dias de vida destes animais, associada aos níveis séricos de Imunoglobulinas, principalmente a IgG, mais elevados neste período e conseqüentemente opsonização destas bactérias.

A produção de peróxido de hidrogênio, após o estímulo com o PMA, mostrou que não diferiu nem em função da ingestão do colostro, nem associada à idade. Estes dados nos permitem afirmar que o PMA é um excelente desencadeador do metabolismo oxidativo de PMNs do sangue de bezerros, e sua ação, independe da idade (em animais do nascimento a 10 dias de vida) e da ingestão de colostro.

Trabalhando com fagócitos do colostro de bubalinos, Della Libera (2002) não encontrou diferenças na liberação de peróxido de hidrogênio de células estimuladas e não estimuladas por PMA, tendo associado tal fenômeno ao fato de que estas células estavam indiferentes ao estímulo por estarem em seu limite máximo de produção.

Estudando os efeitos do midazolan sobre o metabolismo oxidativo de macrófagos peritoneais, Massoco e Palermo Neto, 2003).verificaram valores bem mais elevados de intensidade de fluorescência do que àqueles encontrados para os neutrófilos circulantes estimulados com PMA

Desta forma, entende-se que os mecanismos de produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos estão associados ao seu sítio de ação e principalmente às diferenças de respostas entre os PMNs e monócitos do sangue ou macrófagos teciduais.

A comparação entre os valores das médias e respectivos desvios-padrão da intensidade de fluorescência do metabolismo oxidativo basal e estimulado, mostrou que após a incubação dos PMNs com *S. aureus* ou PMA, ocorreu uma maior liberação de peróxido de hidrogênio em todas as idades, independente da ingestão do colostro. Estes resultados permitem afirmar

que, para o desencadeamento do metabolismo oxidativo, não há necessidade de opsonização prévia do *S. aureus* e do PMA pelas imunoglobulinas fornecidas através do colostro. Todavia, neste desenho experimental não foi possível avaliar a influência do sistema complemento na produção de peróxido de hidrogênio.

Diferente do observado para a *S. aureus* verificou-se que a opsonização que ocorreu após a ingestão do colostro, e das imunoglobulinas colostrais, foi fundamental para o desencadeamento da explosão respiratória induzida pela *E. coli*.

Evidencia-se, portanto, que o desencadeamento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é mais efetivo após a ingestão de colostro pelos bezerros neonatos quando utiliza-se um estímulo bacteriano.

A diferença de resposta das células está relacionada ao mecanismo envolvido na explosão respiratória frente ao estímulo empregado. Desta forma, as bactérias, como a *E.coli*, precisam ser fagocitadas (ZHAO et al., 2003), enquanto que o PMA é um ativador direto da PKC (VUORTE et al, 2001) que independe de opsonização para desencadear o metabolismo oxidativo. Em contrapartida, a utilização de partículas que possam ser ingeridas, permitem uma avaliação mais abrangente do processo.

Outros autores avaliaram o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Hauser et al. (1986) e Peixoto et al. (2002) verificaram que bezerros mais novos (com idades inferiores a 35 dias) apresentam uma menor eficiência de redução do NBT (nitroblue tetrazolium) do que bezerros mais velhos, o que poderia aumentar a susceptibilidade de bezerros jovens às doenças.

Menge et al (1998) estudaram o metabolismo oxidativo de fagócitos de bezerros neonatos e compararam com animais com idades entre três e nove semanas. O metabolismo oxidativo foi induzido pela *E. coli* e pelo PMA. As células dos bezerros neonatos apresentaram maior intensidade de fluorescência e um maior percentual de células positivas

do que as dos bezerros maiores. Esses mesmos autores verificaram que o metabolismo oxidativo diminuiu a despeito da ingestão de colostro ou estímulo aplicado quatro horas após o nascimento.

No presente estudo, também foi verificada uma diminuição da resposta dos PMNs frente a *S.aureus* e *E. coli* após respectivamente 144 e 96 horas p. n. reforçando a afirmação de outros autores da maior susceptibilidade dos animais desta faixa etária. Provavelmente, estas diferenças estão relacionadas às mudanças do quadro leucocitário dos bezerros que ocorre principalmente seis dias após o nascimento, com um predomínio numérico de linfócitos (TEIXEIRA, 1999).

A avaliação da atividade fagocítica de PMNs do sangue de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro ao nascer, utilizando a *S. aureus*, mostrou que tanto a intensidade de fluorescência média como o percentual de PMNs que fagocitaram pelo menos uma bactéria, foi maior após a ingestão de colostro. Considerando os valores médios da média geométrica da intensidade de fluorescência, verificou-se que os animais responderam melhor nos tempos t1 e t2 (ou seja, da ingestão do colostro até 96 horas p.n) e t4. Os valores de t3 e t5 não diferiram entre si nem entre os demais tempos. Dessa forma, pode-se notar a importância do colostro e, indiretamente das opsoninas, na atividade dos fagócitos PMNs de bezerros neonatos.

O percentual de fagocitose aumentou nitidamente após a ingestão de colostro pelos bezerros neonatos, e se manteve elevado por todo o período experimental, ou seja, até 10 dias p.n. Este dado mostra que o colostro é importante para que a atividade fagocítica de PMNs contra a *S. aureus* seja mais efetiva.

Investigando os efeitos da idade na atividade fagocítica e bactericida de PMNs do sangue para *S. aureus*, em bezerros com até 84 dias de vida, Woldewight e Rowan (1990), verificaram uma maior eficiência fagocítica e bactericida (maior que 90%) nos PMNs de

animais com idade inferior a 1 dia em comparação com os animais com idade superior a 14 dias, mantidos em condições ambientais controladas. Estes autores atribuíram essas diferenças ao maior número de neutrófilos que os animais recém-nascidos apresentam em comparação aos bezerros maiores.

Os leucócitos do colostro parecem exercer um efeito benéfico sobre a imunidade humoral do recém nascido, pois animais que ingeriram colostro com células e foram desafiados com a *E. coli* enteropatogênica apresentaram níveis de imunoglobulinas superiores aos de bezerros neonatos que receberam colostro sem células (RIEDEL-CASPARI, 1993).

Diferente dos resultados encontrados para a bactéria *S. aureus*, a *E. coli*, não se mostrou uma boa indutora da fagocitose para PMNs do sangue de bezerros neonatos, após a administração de colostro, já que não houve diferença na intensidade de fluorescência em função da ingestão de colostro pelos recém-nascidos. O percentual de fagocitose também não diferiu entre os tempos.

Menge et al (1998) comparando os percentuais de PMNs que fagocitaram *E. coli* e que induziram a explosão respiratória, encontraram um maior percentual de células positivas para o metabolismo oxidativo acreditando que a maior produção de EROs represente uma compensação para a baixa atividade de fagocitose daquelas células, o que também pode ter ocorrido neste experimento.

Utilizando soro fresco de bezerros para opsonizar as bactérias, Renshaw et al (1976), investigaram a capacidade bactericida de leucócitos do sangue, para *S. aureus* e *E. coli* e verificaram que os fagócitos foram eficientes apenas contra a *S. aureus*. Estes achados foram muito interessantes, pois apesar de não esclarecerem as causas de tal fenômeno, eles podem estar intimamente relacionados à mortalidade de bezerros neonatos associada às infecções entéricas por *E. coli*.

6,2 Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 2

Os resultados da atividade funcional de PMNs obtidos para os bezerros que receberam 2,0 litros de colostro ao nascimento, revelaram que não houve influência da ingestão de colostro e da idade sobre a produção espontânea de peróxido de hidrogênio.

Utilizando as bactérias como estímulos para desencadear o metabolismo oxidativo dos polimorfonucleares, verificou-se uma maior liberação de DCF após a ingestão do colostro, em t2 e t3 (48 - 144 hs. p.n) para a *S. aureus* e em t2 (48-96 hs. p.n.) para *E. coli*. Esses resultados, da mesma maneira que os encontrados para o grupo 1, corroboram a necessidade da ingestão do colostro para a opsonização das bactérias e conseqüentemente uma melhor resposta dos PMNs na indução da explosão respiratória estimulada por estes micróbios.

O estímulo da produção de EROs com PMA, reforçou os achados do grupo 1 de que o mesmo é um bom indutor da resposta pelos PMNs, independente da quantidade de colostro ingerida e da idade do animal.

A comparação da produção de peróxido de hidrogênio dos PMNs basal e induzida pela *S. aureus*, desencadeou uma resposta significativa das células, independente da ingestão do colostro, até os seis primeiros dias de vida do bezerro, mostrando que após este período a bactéria não foi eficiente para desencadear a produção de peróxido de hidrogênio pelas células estimuladas.

Hauser et al (1986) verificaram que os neutrófilos de bezerros mais jovens apresentavam uma menor reação de iodinação e, conseqüentemente, uma menor degranulação dos grânulos primários em comparação com os bezerros mais velhos. Esta diminuição da função dos neutrófilos pode ser considerada um fator para o aumento da susceptibilidade de bezerros jovens às doenças.

A *E. coli*, estimulou o metabolismo oxidativo dos PMNs dos bezerros entre os tempos t₂ e t₄, ou seja, entre 2 e 8 dias de vida, após a ingestão de colostro.

Os resultados da comparação entre o metabolismo basal e induzido pelas bactérias mostraram que houve influência do volume do colostro ingerido sobre esta atividade celular, que foi mais tardia após a ingestão de 2,0 litros de colostro. A diminuição da atividade das células pode ter sido precipitada pela diminuição dos teores séricos de imunoglobulinas, o que não foi avaliado neste trabalho; ou ainda, a inversão do número de linfócitos e neutrófilos que ocorre seis dias após o nascimento (fato que não ocorreu neste experimento).

Da mesma forma que foi anteriormente descrito para o Grupo 1, o PMA foi um bom indutor do metabolismo oxidativo, independente da idade e da ingestão do colostro pelos animais, reforçando as afirmações de que não existe necessidade de opsonização prévia para o desencadeamento da explosão respiratória.

A fagocitose, estimulada pela *S. aureus*, ocorreu de maneira significativa após 48 horas e se manteve até 144 horas, ou seja, mais tardiamente do que para os animais que receberam 4,0 litros de colostro. É interessante notar, que o comportamento com os maiores valores encontrados nestes momentos, foi semelhante ao encontrado na análise do metabolismo oxidativo (Figuras 16 e 22). Este fato pode estar relacionado ao menor volume de colostro mamado que conseqüentemente determinou uma resposta mais demorada.

Em relação ao percentual de fagocitose para *S. aureus*, da mesma forma que no grupo 1, este aumentou de forma significativa após a ingestão do colostro, revelando que a opsonização exerce efeito positivo sobre a atividade fagocítica.

Hauser et al (1986) avaliaram a função de neutrófilos de bezerros com idades entre 4 semanas e 14 meses. O percentual de ingestão de *S. aureus* pelos neutrófilos foi maior para os animais com idades entre 4 e 5 semanas.

Fagócitos de neonatos privados de colostro incubados com *E. coli* por um maior período de tempo, responderam de forma tão efetiva quanto às células de bezerros mais velhos, indicando que neutrófilos de bezerros recém-nascidos precisam de mais tempo para eliminar a bactéria. Esta demora está associada à resposta humoral, pois a mesma melhorou após a opsonização da *E. coli* com um “pool” de plasma de vacas adultas (MENGE et al., 1998).

Renshaw et al (1976), sugeriram que não havia deficiências na função dos fagócitos de bezerros neonatos (antes da ingestão de colostro) pois, quando as bactérias *S. aureus* e *E. coli* foram opsonizadas com o soro de vacas tratado pelo calor, esses leucócitos apresentaram a mesma eficiência bactericida dos fagócitos maternos.

Neste experimento, os fagócitos PMNs não responderam adequadamente à *E. coli*, após a ingestão de dois litros de colostro, em nenhum dos tempos estudados, pois não houve diferença na intensidade de resposta e nem do percentual de fagocitose destas células para este agente. Estes resultados mostram que existe uma dificuldade de resposta dos fagócitos para a *E. coli* que merece ser melhor investigada.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes (2008) que, avaliando a atividade de fagócitos do colostro bovino para a ECET opsonizada e não opsonizada, mensurada indiretamente pela quantidade de peróxido de hidrogênio liberado por estas células, verificou que a estimulação antigênica com esta bactéria não foi suficiente para aumentar a atividade bactericida.

Comparando as respostas dos PMNs frente a essas bactérias (Figuras 23 e 25), verifica-se que a curva da *E.coli* se assemelha a da *S. aureus*, entretanto o percentual médio de fagocitose para a *E. coli* ficou ao redor de 50% nos tempos 2 e 3 enquanto que para a *S. aureus* este percentual, nos mesmos tempos foi superior a 90%.

Fazendo um paralelo com os achados dos autores anteriormente descritos, pode-se supor que houve uma demora por parte dos PMNs do sangue, para responderem de forma adequada após o estímulo, mais associada ao menor volume de colostro ingerido do que com alguma alteração funcional destas células.

6.3 Atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos - Grupo 3

Os animais que não receberam colostro, não apresentaram diferenças relacionadas à idade e ao metabolismo basal e estimulado, independente do agente indutor, em nenhuma das faixas etárias. Este fato mostra a influência positiva da administração do colostro, ou indiretamente das imunoglobulinas, como fator desencadeante da explosão respiratória estimulada.

Lombardo et al. (1979) acompanharam, por 48 horas, bezerros neonatos que ingeriram e não ingeriram colostro e avaliaram a produção de peróxido de hidrogênio de neutrófilos utilizando a *E. coli* opsonizada com soro inativado pelo calor de três origens: soro autólogo de bezerro recém nascido, soro autólogo obtido nos momentos 6, 12, 24 e 48 horas p.n.; e , um “pool” de soro de vacas adultas, com o objetivo de separar as respostas humoral e celular. Considerando as opsoninas utilizadas, Lombardo et al. (1979) verificaram que o “pool” de soro proveniente de animais adultos promoveu o melhor estímulo para o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, seguido do soro autólogo de bezerros e por fim do soro autólogo dos recém-nascidos. Não houve diferenças com relação a ingestão de colostro e o metabolismo oxidativo, quando utilizado o soro de bezerros neonatos como opsonina. Entretanto, utilizando soro autólogo, os neutrófilos dos animais que ingeriram o colostro apresentaram uma maior produção de peróxido de hidrogênio.

Os presentes resultados se assemelham aos de Lombardo et al (1979) que verificaram que os neutrófilos de bezerros neonatos que ingeriram colostro apresentaram uma explosão respiratória maior do que animais que não ingeriram o colostro após as 6 horas de vida e que se manteve por 48 horas. Da mesma forma que observamos neste experimento, antes da ingestão do colostro, não houve diferenças entre os grupos.

A comparação da resposta basal e induzida, sob diferentes estímulos, mostrou que tanto a bactéria *S. aureus*, como o PMA, foram responsáveis por aumentar a produção de EROs em todas as faixas etárias. Estes resultados mostram que a opsonização não é essencial para que ocorra uma maior liberação de peróxido de hidrogênio pelos PMNs do sangue de bezerros neonatos.

A indução do metabolismo oxidativo utilizando a *E.coli*, mostrou um aumento em relação à atividade basal destas células após o tempo t3. Este dado, apesar de isolado, parece bastante interessante e talvez possa estar associado à imaturidade funcional destas células no neonato recém nascido (t0), sugerida por vários autores.

Outra possibilidade é que o uso de antibioticoterapia nestes animais possa ter promovido uma melhora de resposta celular e isto ter se refletido no experimento “in vitro”.

Ao se analisar os resultados da atividade fagocítica dos PMNs do sangue de bezerros neonatos que não ingeriram colostro e a influência da idade, observa-se que não houve diferenças, nem na intensidade de fluorescência nem no percentual de fagocitose, independente da bactéria utilizada como estímulo. O percentual de fagocitose para *S. aureus* foi maior do que para a *E. coli*. Estes resultados destacam a importância do colostro para os fagócitos PMNs.

Estes dados reforçam os encontrados para os animais que ingeriram colostro. A atividade fagocítica dos PMNs destes animais, mostrou até onde pode-se verificar, que não foi afetada por nenhuma alteração de função destas células.

A técnica de citometria permite o uso de sangue total. Os leucócitos são mantidos em ambiente fisiológico junto com nutrientes, eletrólitos e opsoninas naturais. Em contrapartida, outras células, citocinas e componentes do plasma representam fatores desconhecidos que podem influenciar os ensaios. Além disso, a técnica mede o efeito combinado da capacidade do soro opsonizar a bactéria e a capacidade fagocítica de PMNs (KAMPEN et al., 2004).

Neste contexto, pode-se atribuir que a melhor atividade dos fagócitos contra *S. aureus* possa estar relacionada com a opsonização pelo complemento, ou ainda, residir no fato que estes animais apresentavam anticorpos anti-*S. aureus*, que mesmo em quantidades ínfimas poderiam influenciar na capacidade de resposta dessas células. Todavia, isto não explica a baixa resposta destas células para a *E. coli*.

Em relação às diferenças etárias, principalmente no que se refere à diminuição desta atividade com o passar do tempo, existem alguns fatores que poderiam estar relacionados a estes achados e que não foram investigados neste trabalho, como teor de imunoglobulinas e níveis de glicocorticóides séricos. Uma possibilidade para estas diferenças está relacionada à diminuição do número de neutrófilos do sangue e ao aumento do número de linfócitos, entretanto a avaliação do leucograma destes animais não revelou diferenças relacionadas ao número e distribuição dessas células.

6.4 Avaliação comparativa da atividade funcional de PMN do sangue de bezerros neonatos amamentados com quatro litros (G1) e dois litros de colostro (G2) e quatro litros de leite (G3)

O metabolismo oxidativo basal dos PMNs dos bezerros dos três grupos, foi semelhante, exceto na idade entre 96 e 144 hs. p.n. quando apresentaram uma intensidade de fluorescência das células maior no grupo 3 do que a encontrada para os animais do grupo 1.

Tentativas de explicação para este fenômeno poderiam estar relacionadas com a quantidade de colostro ingerido, pois observando a figura 37, pode-se supor que após a ingestão do colostro, os animais atingem um pico máximo de intensidade de fluorescência (t1), ou seja, o colostro de alguma forma estimula o metabolismo celular que vai declinando com o passar do tempo. Os animais do grupo 2, apresentariam esta resposta de forma mais tardia (t2). E os animais do grupo 3 não seriam afetados. Outra possibilidade pode estar relacionada a fatores ambientais, presença de diarreia ou ainda de antibióticos que associados à possibilidade levantada acima, poderiam por exemplo, alterar o padrão leucocitário do sangue e estimular esta resposta celular.

Os leucócitos PMNs estimulados por *S. aureus*, dos animais que receberam 4,0 litros de colostro, produziram uma maior quantidade de peróxido de hidrogênio após a ingestão do colostro em relação aos animais do grupo 3. Apesar de não significativa, os animais do grupo 2 também produziram uma explosão respiratória de maior intensidade em relação aos animais do grupo 3, porém mais tardia que os animais do grupo 1 (Figura 38).

Provavelmente, os resultados foram afetados pelo desvio-padrão elevado que os animais do grupo 1 e 2 apresentaram. O comportamento destas células mostrou a importância da opsonização, melhorando a eficiência de resposta dos PMNs estimulados pela *S. aureus*.

Utilizando a *E. coli* como estímulo, foi possível notar a influência positiva da ingestão de 4,0 litros de colostro sobre a função dos PMNs, relacionada a maior produção de peróxido de hidrogênio após a ingestão do colostro. A resposta dos fagócitos dos animais que ingeriram 2,0 litros de colostro não foi satisfatória (Figura 39), já que não houve diferença entre os animais deste e daquele grupo que não ingeriu colostro.

Analizando estes resultados, verificou-se que a resposta dos PMNs estimulados pela *E. coli* foi de pequena magnitude, mesmo para os animais que ingeriram 4,0 litros de colostro, indicando a existência de algum fator (do animal ou da bactéria) que interfira de forma prejudicial nesta função celular. Adicionalmente, estes dados mostram que a quantidade de colostro ingerida interfere no metabolismo oxidativo dos fagócitos PMNs, estimulados pela *E. coli* de forma mais intensa do que nas respostas induzidas pela *S. aureus*.

Ressalta-se desta forma, que são necessários maiores estudos para reavaliar as práticas de manejo em relação à quantidade de colostro fornecida aos bezerros neonatos ao nascimento e a eficiência do mesmo, na opsonização de bactérias gram positivas e gram negativas.

A estimulação com o PMA mostrou que este é um bom indutor do metabolismo oxidativo de PMNs e que a resposta destas células independe da ingestão de colostro pelos animais, ou seja, não depende de opsonização prévia. Comparando os grupos nota-se menor intensidade de fluorescência para os animais do grupo 1 no tempo t3, quando comparados aos animais do grupo 2 e 3. Este fato parece estar associado as grandes variações individuais de resposta dos animais (associada aos elevados desvios padrão) e não a algum fenômeno biológico (Figura 40).

Comparando a resposta dos PMNs dos animais dos três grupos, nota-se que a média da intensidade de fluorescência emitida por estas células após a incubação com *S. aureus*, foi maior apenas em t4 (144-192 hs. p.n), para os animais do grupo 1 (Figura 41). As variações

individuais, associadas ao desvio padrão elevado encontrado para os animais do grupo 3, podem ter contribuído com estes resultados.

Considerando os achados no tempo t4 e as diferenças na intensidade de fluorescência antes e após a ingestão do colostro pode-se afirmar que este contribui de forma positiva na atividade fagocítica de PMNs contra a *S. aureus*.

O percentual de fagocitose para *S. aureus* foi menor para os animais do grupo 3 no tempo t3 do que para os animais dos outros grupos. Em t5 o percentual de fagocitose do grupo 1 foi maior do que para os animais dos grupos 2 e 3. Estes achados associados, com os resultados discutidos anteriormente, principalmente no que se refere ao aumento da fagocitose após a ingestão de colostro, mostram que a opsonização da bactéria, principalmente pela IgG, aumenta a capacidade fagocítica dos PMNs do sangue de bezerros neonatos (Figura 42).

No tempo t0, ou seja, antes da ingestão do colostro, os PMNs do sangue dos bezerros do grupo 1 apresentaram uma intensidade de fluorescência, após o estímulo com a *E. coli*, maior do que as células dos animais do grupo 3. O percentual de fagocitose para *E. coli*, diferiu entre os grupos 1 e 2, sendo maior para o primeiro no tempo t2, provavelmente associado ao desvio padrão encontrado (Figura 44).

Os resultados associados à atividade fagocítica de PMNs para a *E. coli*, mostraram que não ocorreram diferenças associadas a ingestão de colostro pelos animais. Desta forma, pode-se entender que a opsonização destas bactérias não foi suficiente para induzir nos PMNs uma maior atividade, nem na intensidade de fluorescência nem no percentual de fagocitose destas células, conforme, comentadou-se anteriormente.

A atividade fagocítica de neutrófilos para *E. coli* foi mensurada (LAMOTTE e EBERHART, 1976) em dois grupos de bezerros neonatos que receberam e não receberam colostro durante as primeiras 144 horas de vida. Estes autores verificaram que a fagocitose para a *E. coli* foi ineficiente antes da mamada do colostro, porém, esta aumentou rapidamente

e de forma substancial às 6 horas p.n, tendo sido mais efetiva para os animais que ingeriram colostro. Os pesquisadores atribuíram estes resultados as altas concentrações de imunoglobulinas e possivelmente de complemento nestes animais.

A ineficiência de fagocitose ao nascer pode ser consequência de uma imaturidade funcional dos neutrófilos ao nascimento, talvez até relacionado aos altos níveis de glicocorticóides encontrados ao nascimento e posterior queda às 6 horas p.n (LAMOTTE e EBERHART, 1976).

Outro fato a ser considerado, e não foi investigado neste trabalho, é o papel das opsoninas do complemento. Mueller et al (1983) demonstraram que existe uma variação nos níveis de C3 e do complemento hemolítico no soro de bezerros no primeiro mês de vida e a necessidade de se investigar os fatores envolvidos nesta regulação.

Muitos micróbios patogênicos são capazes de desenvolver estratégias que subvertem a sua detecção pelos fagócitos para que possam estabelecer um nicho de proliferação. Estes mecanismos dependem do tipo de bactéria e da complexidade do processo de fagocitose (UNDERHILL, OZINSKY, 2002). Foi verificado, em seres humanos, que a *E. coli* enteropatogênica suprime o engolfamento através da inibição do sinal da PI 3 quinase nos fagócitos (CELLI et al., 2001). Silva et al. (2007) levantam a possibilidade de que a *E. coli* desenvolva um mecanismo de evasão do sistema imune, que compreende a associação do receptor FcR γ – CD- 16, prolongando a sua sobrevivência no meio extracelular e facilitando assim a translocação bacteriana.

6.5 Exames Complementares

Os valores encontrados para os leucócitos e contagem de polimorfonucleares do sangue de bezerros neonatos foram semelhantes nos três grupos de animais que receberam diferentes volumes de colostro ao nascer, independente da idade. Estes resultados evidenciam que o número de leucócitos totais e de polimorfonucleares do sangue não teve influência sobre a função dos polimorfonucleares.

Os resultados encontrados neste estudo foram semelhantes aos de Benesi (1992) para bezerros da raça holandesa, com idade até 72 horas p.n. e aos de Birgel (1972), sendo um pouco superiores aos encontrados por Teixeira (1999). Estas diferenças podem estar relacionadas ao número de animais deste experimento, entretanto, a ausência de diferença entre os grupos possibilitou uma homogeneidade do número de células avaliadas na citometria em cada uma das idades.

Os valores da proteína sérica total (P.T.) foram menores para os grupos 1 e 2 antes da ingestão de colostro. No grupo 3 não houve diferenças nos valores de proteína sérica em função da idade. Estes dados mostram que o teor de proteínas totais no sangue de bezerros recém-nascidos está fortemente correlacionado com a ingestão de colostro. A comparação do teor da proteína total em cada faixa etária, com exceção do tempo t0 e foi maior para os animais que ingeriram colostro.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Borges et al. (2001), que verificou um aumento dos níveis de proteína sérica nos grupos que mamaram colostro. Os valores de P.T. (g/dl) dos animais no tempo zero, ou seja, antes da ingestão do colostro, foram maiores do que os encontrados por Borges et al. (2001) e inferiores aos valores encontrados por Leal (2003).

Os valores séricos de albumina e a fração alfa globulina se mantiveram estáveis e estão de acordo com os encontrados por Borges et al. (2001) mostrando não ter havido influência da ingestão do colostro.

Os valores encontrados para a fração betaglobulina foram mais baixos antes da ingestão do colostro e para os animais do grupo 3 (que não mamaram somente leite), durante todo o experimento. Não se observou diferenças na avaliação dos animais que ingeriram diferentes quantidades de colostro, quando comparados por faixas etárias. No entanto, para os animais que mamaram 2,0 litros de colostro, o aumento da fração betaglobulina, ocorreu mais tardiamente, 48 horas p.n.

A demora na elevação da fração betaglobulina nos animais do grupo 2 pode estar associada a menor ingestão de colostro. Estes resultados discordam dos encontrados por Borges et al. (2001) que não verificou diferenças entre o volume de colostro ingerido e os teores de betaglobulinas.

A fração gamaglobulina apresentou um aumento após o tempo t0 nos dois grupos de animais que ingeriram o colostro, mantendo-se estável e apresentando um leve declínio no tempo t5 para os animais do grupo 2. Os animais do grupo 3 apresentaram níveis baixos de gamaglobulina durante todo o experimento. Estes resultados se assemelham aos de Borges et al. (2001). Houve diferenças entre os animais dos 3 grupos no tempo t0. Estes valores foram superiores ao achados por Borges et al. (2001) e inferiores aos encontrados por Leal (2003).

A atividade sérica da gamaglutamiltransferase foi baixa nos animais do grupo 3 e antes da ingestão do colostro. O comportamento desta enzima foi semelhante nos dois grupos de animais que ingeriram o colostro. Houve um valor máximo em t1 (até 48 horas p.n.) e depois uma queda progressiva dos níveis séricos até os 10 dias de idade. Diferente do encontrado por Borges et al. (2001), neste trabalho não foi possível observar diferenças no

comportamento da GGT, principalmente às 6 horas, onde estes autores verificaram diferenças entre os animais que receberam diferentes volumes de colostro.

A determinação de imunoglobulinas antes da ingestão do colostro e 48 horas p.n., analisada em conjunto com o proteinograma e a atividade sérica de GGT, teve como intuito a certificação de que os animais deste experimento pertenciam aos grupo correspondentes. O tempo 2 foi escolhido pois apresentava as menores chances de oscilações destas imunoglobulinas no sangue. A análise dos resultados obtidos para IgM, IgG e IgG1 mostraram que nenhum dos animais ingeriu colostro no tempo zero e que os animais do grupo 3 ingeriram leite após este período.

Neste trabalho, foi possível verificar que os PMNs do sangue de bezerros neonatos responderam de forma diferente aos estímulos utilizados para desencadear o metabolismo oxidativo e a fagocitose.

A importância do colostro na imunidade passiva dos bezerros está bem esclarecida. Entretanto, avaliando a atividade funcional dessas células face aos estímulos bacterianos pode-se verificar, “in vitro”, que a resposta destes PMNs do sangue é melhor quando os animais recebem quatro litros de colostro aos nascer.

Finalmente, maiores estudos são necessários para que se possa compreender os mecanismos envolvidos com a atividade funcional destes fagócitos para a *Escherichia coli*.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista, a análise dos resultados obtidos e de acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que:

- a. O metabolismo oxidativo basal e o estimulado por PMA de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro”, não foi influenciado pela ingestão de colostro.
- b. O desencadeamento da explosão respiratória de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro” induzido pela *S. aureus* foi melhor após a ingestão de 4,0 litros de colostro. A bactéria *S. aureus* estimulou o metabolismo oxidativo de PMNs independentemente do fornecimento do colostro.
- c. O metabolismo oxidativo de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro” induzido pela *E.coli* apresentou maior intensidade de fluorescência após a ingestão de 4,0 litros de colostro. A *E. coli* não se mostrou uma boa indutora do metabolismo oxidativo nos animais que não ingeriram o colostro.
- d. A intensidade de fluorescência e o percentual de fagocitose dos PMNs estimulada pelo *S. aureus* foi maior após a ingestão de quatro litros de colostro. A ingestão de dois litros de colostro provocou uma resposta de intensidade de fluorescência mais tardia dos fagócitos estimulados por *S. aureus*, que depois declinou; o percentual de fagocitose foi maior após a ingestão do colostro
- e. O estímulo com a *E. coli* não foi eficiente para o desencadeamento da fagocitose por PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro”.

- f. Não ficou esclarecida a influência da idade na atividade funcional de PMNs do sangue de bezerros neonatos “in vitro”
- g. O fornecimento de 4,0 litros de colostro para os bezerros neonatos permitiu uma melhor resposta funcional dos PMNs (metabolismo oxidativo e fagocitose) quando foi utilizado um estímulo bacteriano.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland, 2002. 1616 p.

ANDREASEN, C. B.; ROTH, J. A. Neutrophil functional abnormalities. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 356-365.

AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos**. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Clínica veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 13, p. 721-725, 1978.

BAEHNER, R. L.; BOXER, L. A.; DAVIS, J. The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 48, n. 2, p. 309-313, 1976.

BENESI, F. J. Diarréia infecciosa neonatal dos bezerros. In: I Simposio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos, 1996, São Paulo. **Anais**, 1996. p. 15-24.

BENESI, F. J. **Hematologia de bezerros recém-nascidos. Influência da asfixia neonatal, do tipo do parto e da ingestão de colostro sobre a crase sangüínea**. 1992. 126 f. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

BENESI, F. J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação crítica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, v. 16, n. 01, p. 38-48, 1993.

BENESI, F. J.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; COELHO, C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. . Parâmetros bioquímicos para avaliação da função hepática em bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês de vida. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 311-317, 2003.

BESSER, T. E.; GAY, C. C. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. **Veterinary Clinics of North America**, v. 10, p. 107-117, 1994.

BIRGEL, E. H. **Hämatologische Untersuchungen bei Kälber der Rasse Deutsches Schwartzbuntes Rind" in den ersten 14 Lebenstagen**. Hannover, 1972, p. 89. Tierärztliche Hochschule Hannover (Tese)

BIRGEL, E. H. Hematologia Clínica Veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-49.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALES, E. A.; MORA, A.; JANSEN, W. GOMES, T. A. T.; ZERBINI, L. F.; YANO BLANCO, M.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; BLANCO, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2958-2963, 1997.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO J. E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n. 9, p. 1446-1451, 1993.

BOHLAND, E.; SÁ-ROCHA, V. M. ; CYRILLO, F. C.; BENESI, F. J. . Efeito do tempo de conservação de polimorfonucleares do sangue de bezerros sobre o metabolismo oxidativo e a atividade de fagocitose de E. coli. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 1, 2008 (no prelo).

BOHMER, R. H.; TRINKLE, L. S.; STANECK, J. L. Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. **Cytometry**. v. 13, n. 5, p. 525-531, 1992.

BORGES, A. S.; **Avaliação da eficácia da administração de plasma por via intravenosa como tratamento da falência de transferência de imunidade passiva em bezerros da raça holandesa**. 1997. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

BORGES, A. S.; FEITOSA, F. L. F.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; MENDES, L. C. N. Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, 2001.

BUSH, L. J.; STALEY, T. E. Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 672–680, 1980.

CARTER, P. H.; RESTO RUIZ, S.; WASHINGTON, G. C.; ETHRIDGE, S.; PALINI, A.; VOGT, R.; WAXDAL, M.; FLEISHER, T; NOGUCHI, P. D.; MARTI, G.E. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. **Cytometry**, v. 13, n. 1, p. 68-74, 1992.

CELLI, J.; OLIVIER, M.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 6, p. 1245-1258, 2001.

CORTESE, V.S. **Neonatal immunology**. 2004, disponível em: <http://www.cvm.umn.edu/img/assets/9090/cortese%20proc.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2007.

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

DOS SANTOS, G. T. **Imunidade passiva e colostrar nos bovinos**. (2004), Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/passivacolostral.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2007.

DUCUSIN, R. J. SARASHINA, T.; UZUKA, Y.; TANABE, S.; OHTANI, M. Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants in vitro. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 1, p. 38-44, 2001.

ELASS-ROCHARD, E.; LEGRAND, D.; SALMON, V.; ROSEANU, A.; TRIF, M.; TOBIAS, P.S.; MAZURIER, J.; SPIK, G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide binding-protein. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2; p. 486-491, 1998.

ERDURAN, E.; TEKELIOGLU, Y.; GEDIK, Y.; YILDIRAN, A. Apoptotic effects of heparin on lymphoblasts, neutrophils, and mononuclear cells: results of a preliminary in vitro study. **American Journal of Hematology**, v. 61, n. 2, p. 90-93, 1999.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.

FEITOSA, F. L. F. **Dinâmica do proteinograma e da atividade da Gamaglutamiltransferase no soro sangüíneo de bezerros desde o nascimento até um ano de idade e de vacas, antes e após o parto, da raça holandesa**. 1998. 219 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

FEITOSA, F. L. F. Exame físico geral ou de rotina. In: _____. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. p. 77-102.

FRIEDMAN, H. S. A standardized procedure for serum protein eletrophoresis on cellulose acetate membrane strips. **Clinica Chimica Acta**, v.6, p. 775

GARHR, M.; SPEER, C. P.; DAMERAU, B.; SWATZKI, G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, n. 5, p. 427-433, 1991.

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

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; YOHNOSUKE, K. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53

HAUSER, M. A., KOOB, B. S., JAMES, A. R. Variation of neutrophil function with age in calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 152-153, 1986.

HODGSON, J. C.; WATKINS, C. A.; BAYNE, C. W. Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and effects of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocyte in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 1-2, p. 12-23, 2006.

HOLMES, R.K., TWIDDY, E.M., PICKETT, C.L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 3, p. 464-473, 1986.

HONORIO, A. C. **Atividade bactericida dos fagócitos do colostro humano para a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**. 1995. 125 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

HOUSTON, D. M.; RADOSTITIS, O. M.; O exame clínico. In: RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 71 – 97.

JAIN, N. C.; PAAPE, M. J.; MILLER, R. H. Use of flow cytometry for determination of differential leukocyte counts in bovine blood. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 4, 1991.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 6. ed. New York: Garland, 2004, 800 p.

KAMPEN, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J. A.; FRANK, D. E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, n. 1-2, p. 405-14, 2004.

KREMERS, B.; BRIERE, R.; BATSAKIS, J.G. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein electrophoresis. **American Journal of Medical Technology**, v.33, n. 1, p. 28-34, 1967.

LAKRITZ, J.; TYLER, J.W.; HOSTETLER, D.E.; MARSH, A.E.; WEAVER, D.M.; HOLLE, J.J.; GEEVENS, B.J.; DENBIGH, J.L. Effects of pasteurization of colostrum on subsequent serum lactoferrin concentration and neutrophil superoxide production in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n. 9, p.1021-1024, 2000.

LAMOTTE, G. B.; EBERHART, R. J. Blood leukocytes, neutrophil phagocytosis, and plasma corticosteroids in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.37; n.10, p. 1189-93, 1976.

LEAL M. L. R.; BENESI F. J.; LISBÔA, J. A. N.; COELHO C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. **Proteínoograma sérico de bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês pós nascimento**, Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 40, n. 2, p. 138-145, 2003.

LEE, W. J.; FARMER, J. S.; HILTY, M.; KIM, Y. B. The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. **Infection and Immunity**, v.66, n. 4, p. 1421-1426, 1998.

LISBOA, J. A. N. L.; BENESI, F. J.; LEAL, M. L. R.; TEIXEIRA, C. M. C. **Temperatura retal e frequências respiratória e cardíaca de bezerras sadias no primeiro mês de vida**. Veterinária Notícias, v. 9, n. 2, p. 83-89, 2003.

LOMBARDO, P. S.; TODHUNTER, D. A.; SCHOLZ, R. W.; EBERHART, R. J. Effect of colostrum ingestio on indices of neutrophil phagocytosis and metabolism in newborn calves. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.40; n.3, p. 362-368, 1979.

LUCCI, C. **Bovinos leiteiros jovens**. São Paulo: Nobel/Edusp, 1989, p. 110-145.

MANCINI, G; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Imunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion, **Imunochemistry**, v. 2, n. 3, p. 235-254, 1965.

MASSOCO C.; PALERMO-NETO J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study, **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.

MASSOCO-SALLES GOMES, C. O. **Receptores benzodiazepínicos periféricos e a resposta imune inata de eqüinos: efeito do midazolan**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MAUG, J. H. Singlet oxygen: a unique microbicidal agent in cells. **Science**, v. 182, n. 5, p. 44-45, 1973.

MENGE, C.; NEUFELD, B.; HIRT, W.; SCHMEER, N.; BAUERFEIND, R.; BALJER, G.; WIELER, L.H. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 4, p. 309 – 21, 1998.

MIGLIORE SAMOUR, D; ROCH ARVEILLER, M; TISSOT, M; JAZZIRI, M; KEDDAD, K; GIROUD, J. P; JOLLES, P. Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. **Biochemical Pharmacology**, v.44, n.4, p.673-680, 1992

MUELLER, R.; BOOTHBY, J. T.; CARROLL, E. J.; PANICO, B. S. Changes of complement values in calves during the first month of life. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 5, p.747-750, 1983.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; DE CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

OOSTVELDT, K. V.; BURVENICH, C.; SILVA, F. M.; MASSART-LEËN, A. M.. Respiratory burst activity in activated and unstimulated isolated bovine blood neutrophils during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis, **Journal of Dairy Research**, v.66, n. 3, p. 375-383, 1999.

OZKARAGOZ F.; RUDLOF H. B.; RAJARAMAN S.; MUSHTAHA A. A.; SCHMALSTIEG F.C.; GOLDMAN A. S. The motility of human milk macrophages in collagen gels. **Pediatric research**, v.23, n. 5, p. 449-52, 1988.

PARASKEVAS, F. Clinical flow cytometry. In: LEE, G. R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G. M. **Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 56-71.

PARK, B. H., GOOD, R. A. N.B.T. Test stimulated. **Lancet**, v. 19, n. 2, p. 616, 1970.

PERES, J. R. **Importância do fornecimento de colostro**. 2000. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?actA=9&erroN=1&areaID=73&referenciaURL=noticiaID=16627||actA=7||areaID=61||secaoID=184>>. Acesso em 15 out. 2007.

QUIGLEY, J. D.; DREWRY, J. J. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. **Journal of Dairy Science**, v.81, n. 10, p.2779-2790, 1998.

QUIGLEY, J. D.; MARTIN, K. R.; BEMIS, D. A.; POTGIETER, L. N.; REINEMEYER, B. W.; ROHRBACH, B. W.; DOWLEN, H. H.; LAMAR, K. C.. Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.15, p. 3124-3131, 1994.

RIEDEL-CASPARI, G. The influence of colostral leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 275-288, 1993.

SALGAR, S. K.; PAAPE, M. J.; ALSTON-MILLS, B.; MILLER, R. H. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 8, p. 1201-7, 1991.

SA-ROCHA, V. M. **Aspectos neuroimunes de camundongos mantidos em uma relação social estável**. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SERIWATANA, J.; ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D. N.; RASRINUAL, L.; BROWN, J. E.; PEIRIS, J. S.; CLAYTON, C. L. Type II enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1158-1161. 1988.

SHEPHERD, V. L. The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 1, n. 2, p. 99-106, 1986.

SILVA, F. P.; ALOULOU, M.; SKURNIK, D.; BENHAMOU, M.; ANDREMONT, A.; VELASCO, I. T.; CHIAMOLERA, M.; VERBEEK, J. S.; LAUNAY, P. MONTEIRO, R.C. CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through a Fc γ inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 11, p. 1368-1374, 2007.

SILVA, F. R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo**. 2003. 179 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SMITS, E.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3, p. 259-269, 1997.

STATSDIRECT LTD. StatsDirect statistical software version 2.6.6, 2008.

STÖBER, M.; Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame clínico geral. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger**: exame clínico dos bovinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 44-80.

STOTT, G. H., Immunoglobulin absorption in calf neonates with special considerations of stress. **Journal of the Arizona Agricultural Experiment Station**, v. 3018, n. 3, p. 681-688, 1979.

STOTT, G. H.; FELLAH, A. Colostral immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p. 1319-1328, 1983.

STOTT, G. H.; MARX, D. B.; MENEFEE, B. E.; Nightengale. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. **Journal of Dairy Science**, v.62, n. 10, p.1632-1638, 1979.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum gama-glutamyl transpeptidase. **Clinical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 124-135, 1969.

TEIXEIRA, C. M. C. **Hemograma de bezerras sadias, da raça Holandesa Preta e Branca, do nascimento até um mês de vida**. 1999. 84 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

TIZARD, I. R. Imunidade no feto e no recém-nascido. In: _____. **Imunologia veterinária**: uma introdução. São Paulo: Roca, 2002. p 233-246.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v.20, p. 825-852, 2002.

VAN OOSTVELDT, K. et al. Respiratory burst activity in activated and unstimulated isolated bovine blood neutrophils during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis, **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 3, p. 375-383, 1999.

VUORTE, J.; JANSSEN, S. E.; REPO, H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. **Cytometry**, v. 43, n. 4, p. 290-296, 2001.

WEISS, D. J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 2, p. 72-82, 2002.

WITTUM, T. E.; PERINO, L. J. Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n. 9, p.1149-1154, 1995.

WOLDEHIWET, Z.; ROWAN, T. G. Some observations on the effects of age of calves on the phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leucocytes. **British Veterinary Journal**, v. 146; n. 2, p. 165-170, 1990.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

ZHAO, J. et al. Respiratory burst activity of polymorphonuclear cells is dependent on the cell preparation technique. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 47, n. 6, p.702-706, 2003.

ANEXO

Nos citogramas a seguir verifica-se um aumento no tamanho (deslocamento da população de polimorfonucleares à direita do eixo x referente à propriedade FSC) e da complexidade das células (SSC) que foram incubadas com as bactérias (Figuras 57, 58, 60, 61) e PMA (Figura 62) quando comparadas com a população de células não estimuladas (Figura 56 e 59), mostrando que na fagocitose e na explosão respiratória estimulada ocorrem alterações na morfologia celular e que a técnica de citometria de fluxo é capaz de verificar esta modificação.

Figura 56 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro. Em destaque a população de polimorfonucleares - São Paulo - 2008

Figura 57 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro incubados com *S. aureus* marcado com PI. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo - 2008

Figura 58 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro incubados com *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo - 2008

Figura 59 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 2,0 litros de colostro incubados com DCFH-DA. Destaca-se a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo - 2008

Figura 60 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram leite ao nascer incubados com DCFH-DA e *S. aureus* marcado com PI. Destaca-se a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo - 2008

Figura 61 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram leite ao nascer incubados com DCFH e *E. coli* marcada com Alexa Fluor 594. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo - 2008

Figura 62 - Citograma de leucócitos circulantes de bezerros neonatos que ingeriram 4,0 litros de colostro incubados com DCFH e PMA. Em destaque a população de polimorfonucleares do sangue - São Paulo - 2008