VIVIANI GOMES

**COMPONENTES IMUNOLÓGICOS DO COLOSTRO BOVINO: CÉLULAS,
TEORES DE IMUNOGLOBULINAS E ATIVIDADE BACTERICIDA DOS
FAGÓCITOS PARA A *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA (ECET)**

São Paulo

2008

VIVIANI GOMES

Componentes imunológicos do colostro bovino: células, teores de imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET)

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.1956
FMVZ

Gomes, Viviani
Componentes imunológicos do colostro bovino: células, teores de imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET) / Viviani Gomes. – São Paulo: V. Gomes, 2008.

106 f. : il.

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

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Bovino. 2. Colostro. 3. Citologia. 4. Fagócitos.
5. Imunoglobulinas. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET)", protocolado sob o nº1273/2008, utilizando 25 (vinte e cinco) 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 "ad referendum" da referida Comissão.

We certify that the Research "Evaluation of the bactericidal activity of the phagocytes of the bovine colostrum for the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)", protocol number 1273/2008, utilizing 25 (twenty five) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Fernando José Benesi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 18 de fevereiro de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOMES, Viviani

Título: Componentes imunológicos do colostro bovino: células, teores de imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET)

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 _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

EPÍGRAFE

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito,
e não em ter condições de êxito”.*

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIAS

*Dedico este trabalho a Deus que iluminou e ilumina diariamente a
minha vida!*

*Dedico este trabalho ao meu pai, Antenor Gomes, que nunca mediu
esforços para chegar aos seus objetivos. É meu espelho de vida:
perseverante, estudioso e extremamente esforçado! Espero ter
herdado um pouco destas virtudes, pois tentei aprendê-las!*

*Dedico este trabalho a minha mãe, Inês de Lima Gomes, que me
deu amor, e que mesmo longe, sempre está presente em meus
pensamentos!*

*Dedico este trabalho aos meus irmãos, sempre unidos, e ajudando
um aos outros! Tenho muito orgulho de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando José Benesi, muito mais que um orientador! Às vezes comportou-se como um pai, com estímulos e palavras amigas.

À Prof. Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera, inicialmente minha professora de graduação, orientadora de iniciação científica e parceira. Hoje tenho muito orgulho em dizer que ela é uma pessoa muito importante na minha vida e uma amiga incondicional.

À Dra Gerlândia Neres Pontes, um anjo que apareceu na minha vida durante a fase experimental do doutorado. Ajudou na padronização das técnicas laboratoriais da atividade bactericida indireta dos fagócitos.

À Prof. Maria Elisa Carbonari, diretora da área de pesquisa e pós graduação da Anhanguera Educacional, por ter concedido a utilização dos laboratórios da área da saúde da unidade Leme, para a realização de algumas etapas experimentais desta tese.

À Mariane Compri, Gerente de Laboratórios da Área da Saúde e Ciências Agrárias da Anhanguera Educacional, que me ensinou muito sobre ética profissional e trabalho em equipe. Sinto muito orgulho de ter feito parte da sua equipe! Obrigado por tudo!

À Karina Medici Madureira, que prestou amizade verdadeira durante todo o período de graduação, residência, mestrado e doutorado! Companheira das madrugadas de experimento em Leme e Pirassununga!

À amiga de pós-graduação Maiara Blagitz, amizade recente, porém antiga no coração!

Às estagiárias e estagiários: Jéssica Moura, Fernanda Baptistella, Amanda Frare, Nathália Luvizotti, Mara Abreu, André Moreno, Mirna Alves e Alexandre Benesi..

À Cláudia Scatolini Bonatto, biomédica do Hospital Veterinário da Anhanguera Educacional de Leme, que ajudou no preparo de material e processamento de amostras.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, Prof. Dra Lílian Gregory, prof. Dra Maria Cláudia Araripe Sucupira, Prof. Wilson Roberto Fernandes, Prof. Dr Archivaldo Reche Junior, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Prof. Dr. Cássio Xavier de Mendonça Junior, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin e Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas pela convivência harmoniosa.

Aos funcionários do Hovet da USP de Pirassununga, em especial ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Lopes Correa da Silva e M.V. Ubiraem Mário Schialchi, por cederam o local para a instalação de alguns equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

À todos os amigos do Hospital Veterinário da Anhanguera Educacional de Leme, M.V. Andréa Mello Santilli, M.V. Anderson Mathiesen, M.V. Juliano H. V. Tojal, Kelly Ingrid, Ossias Bernegossi, André Moraes, seu Fernando, dona Cláudia e Paloma.

Aos funcionários da Fazenda Colorado, em especial ao M.V. Sérgio Soreano e toda equipe da ordenha, que abriu as portas da fazenda para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia da USP, em especial ao Valmir, pelas intermináveis ligações após os partos das vacas doadoras de colostro.

Ao aluno Eduardo Capodifoglio, pela permissão e ajuda na colheita de colostro das vacas da Fazenda Jamava.

Ao Marcos, administrador da Fazenda Vista Alegre, pelos avisos sobre os partos e ajuda na colheita das amostras de colostro.

A amiga Sandra Kitamura pela ajuda na estatística dos resultados encontrados neste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Clínica Médica e Pós-graduação, em especial à Adelaide, que ofereceu orientações fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Fapesp pela concessão de Auxílio Pesquisa Processo n. 05/50548-6, para a implementação desta tese.

RESUMO

GOMES, V. **Componentes imunológicos do colostro bovino: células, teores de imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET).** [Immunological components of bovine colostrum: cells, immunoglobulin content and bactericidal activity of phagocytes against enterotoxigenic *Escherichia coli*]. 2008. 106 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Estudou-se quantitativamente e qualitativamente a citologia, os teores de imunoglobulinas, e a atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino contra a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET), analisando-se a influência da opsonização prévia destas células. Para tal finalidade foram utilizadas 53 vacas da raça Holandesa, das quais realizou-se a colheita de um total 212 amostras de colostro obtidas antes da primeira e segunda ordenha. As amostras positivas (n=41) ao exame bacteriológico do leite foram excluídas desta pesquisa. Para a análise citológica quantitativa e qualitativa do colostro, foram utilizadas as técnicas de microscopia direta e citocentrifugação, respectivamente. As dosagens das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) foram realizadas por meio da técnica de imunodifusão radial, utilizando-se Kits comerciais. Para a avaliação da atividade bactericida indireta dos fagócitos e verificação da influência da opsonização prévia da ECET, foram realizados os seguintes ensaios: utilizando somente suspensão de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares em meio de cultura (Grupo Controle – C); suspensão de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares adicionados a suspensão de ECET não opsonizada (Grupo NO); suspensão de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares adicionados a suspensão de ECET previamente opsonizada com 10% de sobrenadante de colostro bovino delipidado (Grupo O). A atividade bactericida indireta dos fagócitos foi mensurada por meio da quantidade de nmoles de peróxido de hidrogênio liberado por estas células, nos ensaios C, NO e O. Após as avaliações dos resultados das determinações realizadas, conclui-se que: (1) o colostro bovino de segunda ordenha apresenta maior quantidade de células/mL, que aquele de primeira ordenha; (2) a

predominância celular demonstrada com o uso das técnicas de microscopia direta e de citocentrifugação foi de células mononucleares; (3) colostro bovino de segunda ordenha possui maior quantidade de neutrófilos polimorfonucleares, quando comparada àquela da primeira ordenha, utilizando as técnicas de microscópica direta e de citocentrifugação, para a contagem dos tipos leucocitários; (4) os tipos celulares predominantes no colostro bovino de primeira e segunda ordenha foram macrófagos/células epiteliais, seguidos por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, utilizando a técnica de citocentrifugação para diferenciação celular; (5) o colostro bovino de primeira ordenha possui maiores teores de imunoglobulinas das classes G e M, que o da segunda ordenha, havendo predomínio da IgG, sobre a IgM e IgA independente da ordem de ordenha. (6) os fagócitos do colostro bovino de primeira ordenha apresentaram maior atividade celular avaliada pela liberação de peróxido de hidrogênio, que os da segunda ordenha; (7) a estimulação antigênica com ECET não foi suficiente para aumentar a atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino; (8) a opsonização da ECET com soro colostrar não determinou diferenças significativas na atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino, mensurada pela quantidade de peróxido de hidrogênio liberado por estas células; (9) existe correlação positiva entre os teores de imunoglobulinas da classe M e a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos do colostro bovino; (10) o comportamento quantitativo observado para as imunoglobulinas e células do colostro bovino, considerando a ordem das ordenhas, sugere que os anticorpos teriam função prioritária na imunidade do neonato, enquanto o aumento de neutrófilos estaria voltado aparentemente para a proteção da glândula mamária.

Palavras-chave: bovino, colostro, citologia, fagócitos, imunoglobulinas,

ABSTRACT

GOMES, V. **Immunological components of bovine colostrum: cells, immunoglobulin content and bactericidal activity of phagocytes against enterotoxigenic *Escherichia coli***. [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) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Bovine colostrum cytology, immunoglobulin content and bactericidal activity of phagocytes against enterotoxigenic *Escherichia coli* were studied qualitatively and quantitatively, analyzing the influence of previous opsonization of the bacterium. In order to achieve this aim, 53 Holstein cows were used to obtain 212 colostrum samples before the first and second milkings. Samples positive (n=41) in the bacteriological examination of milk were excluded from the trial. Direct microscopy and cytocentrifugation were used in the quantitative and qualitative cytological analysis of colostrum, respectively. Immunoglobulin (IgG, IgM and IgA) contents were determined by means of radial immunodiffusion using commercial kits. Indirect bactericidal activity of phagocytes and assessment of the influence of ETEC previous opsonization were carried out as follows: using only a suspension of mononuclear and polymorphonuclear phagocytes in culture medium (Control group – C); suspension of mononuclear and polymorphonuclear phagocytes added to a suspension of non-opsonized ETEC (NO group); suspension of mononuclear and polymorphonuclear phagocytes added to an ETEC suspension previously opsonized with 10% of supernatant of delipidated bovine colostrum (O group). Indirect bactericidal activity of phagocytes was measured by means of the amount of hydrogen peroxide nmoles released by these cells in assays C, NO and O. After results were evaluated, it was concluded that: (1) bovine colostrum obtained in the second milking showed more cells/mL than first milking colostrum; (2) the predominance of mononuclear cells was determined by both direct microscopy and cytocentrifugation; (3) bovine colostrum obtained in the second milking showed greater quantity of polymorphonuclear neutrophils than that of the first milking, as

determined in cell type counts by direct microscopy and cytocentrifugation; (4) cell types predominating in bovine colostrum of the first and second milking were macrophages / epithelial cells, followed by lymphocytes, neutrophils and eosinophils, respectively, using cytocentrifugation for cell differentiation; (5) first milking bovine colostrum showed greater levels of immunoglobulins G and M than that of the second milking, with a predominance of IgG compared with IgM and IgA, no matter the milking order; (6) phagocytes in first milking colostrum showed greater cell activity than those in the second milking colostrum, as evaluated by hydrogen peroxide release; (7) antigenic stimulation of ETEC was not enough to increase bactericidal activity of phagocytes in bovine colostrum; (8) ETEC opsonization with colostrum serum did not lead to significant differences in bactericidal activity of bovine colostrum phagocytes, as measured by the amount of hydrogen peroxide released by these cells; (9) there was a positive correlation between the contents of immunoglobulin M and the amount of hydrogen peroxide released by phagocytes in bovine colostrum; (10) quantitative behavior observed for immunoglobulins and cells of bovine colostrum considering the milking order, suggest that antibodies would have an essential function in neonate immunity, whereas the increase in neutrophils would apparently be linked to mammary gland protection.

Key words: bovine, colostrum, cytology, phagocytes, immunoglobulins.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Opsonização da ECET. São Paulo, 2008.....	54
Quadro 2 – Fagocitose da ECET. São Paulo, 2008	55
Quadro 3 – Modelo esquemático sobre o preenchimento da placa ELISA A/2 com o sobrenadante de cada um dos ensaios realizados, para a avaliação indireta da ação dos fagócitos do colostro bovino contra a ECET. São Paulo, 2008	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcentagens de amostras positivas e negativas no exame bacteriológico do colostro bovino considerando a amostragem total. São Paulo, 2008	60
Gráfico 2 – Mediana dos valores absolutos dos leucócitos (células/mL) do colostro bovino, conforme a ordem da ordenha pós-parto. São Paulo, 2008	62
Gráfico 3 – Valores médios relativos obtidos no exame diferencial dos leucócitos do colostro bovino antes da primeira ordenha pós-parto. São Paulo, 2008	64
Gráfico 4 – Valores médios relativos obtidos no exame diferencial dos leucócitos do colostro bovino antes da segunda ordenha pós-parto. São Paulo, 2008	64
Gráfico 5 – Histograma representando os valores medianos absolutos dos tipos leucocitários observados no colostro bovino por meio da técnica de citocentrifugação. São Paulo, 2008.....	66
Gráfico 6 – Concentração de imunoglobulinas da classe G (mg/dL) nas amostras de colostro bovino obtidas antes da primeira e da segunda ordenha. São Paulo, 2008	69
Gráfico 7 – Concentração de imunoglobulinas da classe A (mg/dL), nas amostras de colostro bovino obtidas antes da primeira e da segunda ordenha. São Paulo, 2008	70
Gráfico 8 – Concentração de imunoglobulinas da classe M (mg/dL) nas amostras de colostro bovino obtidas antes da primeira e da segunda ordenha. São Paulo, 2008	70
Gráfico 9 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) pelos fagócitos obtidos do colostro bovino de primeira e segunda ordenha pós-parto no grupo controle. São Paulo, 2008	72
Gráfico 10 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) pelos fagócitos obtidos do colostro bovino de primeira e segunda ordenha pós-parto, no grupo contendo células e ECET não opsonizada. São Paulo, 2008	72
Gráfico 11 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) pelos fagócitos obtidos no colostro de primeira e	

segunda ordenha pós-parto, no grupo contendo células e ECET opsonizada com soro do colostro bovino. São Paulo, 200873

Gráfico 12 – Correlação entre a quantidade de imunoglobulinas da classe M e peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos do colostro bovino no grupo C (Controle). São Paulo, 2008.....74

Gráfico 13 – Correlação entre a quantidade de imunoglobulinas da classe M e peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos do colostro bovino no grupo NO (Fagócitos e ECET não opsonizada). São Paulo, 200874

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo esquemático para demonstrar o transporte seletivo de IgG1 e IgG2 entre o epitélio e o lúmen alveolar da glândula mamária (LASCELLES, 1979)	33
Figura 2 –	Vista interna e externa da sala de ordenha da fazenda produtora de leite tipo A, 2008.....	44
Figura 3 –	Fagócitos viáveis do colostro bovino de segunda ordenha, não impregnados pelo corante azul de trypan. São Paulo, 2008.....	51
Figura 4 –	Reação do soro do colostro bovino na placa contendo agar impregnado com anti igG bovina. São Paulo, 2008	53
Figura 5 –	Placa de ELISA A/2 preparada para leitura em microleitor ELISA a 630 nanômetros. São Paulo, 2008.....	58
Figura 6 –	Fotomicrografias das células do colostro bovino, empregando-se a técnica de Prescott e Breed (1910), coloração de Rosenfeld (1949) e microscopia óptica de imersão (1000 x). São Paulo, 2008	62
Figura 7–	Fotomicrografias das células do colostro bovino, identificadas morfológicamente, empregando-se microscopia óptica de imersão (1000x). São Paulo, 2008	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediana dos valores absolutos dos leucócitos (células/mL), conforme a ordem da ordenha pós-parto. São Paulo, 2008	61
Tabela 2 – Média dos valores relativos dos leucócitos do colostro bovino, conforme a ordem da ordenha pós-parto. São Paulo, 2008	63
Tabela 3 – Valores medianos absolutos dos tipos leucocitários (Ne – neutrófilos; Li – linfócitos; Mo+EP – macrófagos e células epiteliais) observados no colostro bovino, conforme o momento da colheita. São Paulo, 2008	66
Tabela 4 – Concentração das classes de imunoglobulinas nas amostras de colostro bovino, obtidas antes da primeira e segunda ordenha. São Paulo, 2008	69
Tabela 5 – Valores medianos da concentração de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) produzida pelos fagócitos do colostro bovino, na ausência ou presença de ECET opsonizada ou não opsonizada (C=controle, NO=ECET não opsonizada; O=ECET opsonizada. São Paulo, 2008.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECET: *Escherichia coli* enterotoxigênica
F5: antígeno fimbrial 5
K99: antígeno capsular
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica
FTIP: Falha na transferência de imunidade passiva
Ig: Imunoglobulinas
IgG: Imunoglobulina da classe G
IgG1: Imunoglobulina da classe G e subclasse 1
IgG2: Imunoglobulina da classe G e subclasse 2
IgA: Imunoglobulina da classe A
IgM: Imunoglobulina da classe M
CCS: contagem de células somáticas
CD14: “cluster differentiation”
LPS: lipopolissacarídeo
TNF α : Fator de necrose tumoral α
GALT: “gut associated lymphoid tissue”
S aureus: *Staphylococcus aureus*
NADPH: Nicotinamida Adenosina Difosfato
SOD: Superóxido desmutase
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP: Universidade de São Paulo
PBS: tampão fosfato para lavagem de células
FCR: Força centrífuga relativa
C: grupo controle
NO: Não opsonizada
O: Opsonizada
RPMI: Meio de cultura para células
BHI: “brain heart infusion”
TSA: “tryptic soy agar”
VMRD: “Veterinary Medical Research & Development”

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D.O: Densidade óptica

ELISA: “Enzyme linked immuno sorbent assay”

PMN: polimorfonuclear

MN: mononuclear

NE: neutrófilos

LI: linfócitos

MO: macrófagos

EP: células epiteliais

UFC: unidade formadora de colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	miligramas
mL	mililitros
%	porcentagem
G	gramas
L	litros
rpm	rotações por minuto
°C	Graus Celsius
μL	microlitro
cm ²	centimetro quadrado
mm ²	milimetro quadrado
NaOH	hidróxido de sódio
N	normal
nm	nanômetro
nmoles	nanômoles
dL	decilitro
p	significância
r	Correlação de Pearson
O ₂	oxigênio
pH	concentração hidrogeniônica
O ₂ ⁻	superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH ⁻	Radical hidroxila
¹ O ₂	oxigênio singleto
g/G	força gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Contagem Total dos Leucócitos do Colostro Bovino	28
2.2 Contagem Diferencial dos Leucócitos do Colostro Bovino	30
2.3 Imunoglobulinas do Colostro Bovino	32
2.4 Atividade Bactericida dos Fagócitos Mononucleares e Polimorfonucleares do Colostro Bovino e sua relação com a Concentração de Imunoglobulinas do Colostro Bovino.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Animais utilizados.....	41
3.2 Obtenção das amostras individuais de colostro	42
3.3 Método de Colheita das amostras de colostro	45
3.4 Análise citológica quantitativa: contagem dos leucócitos do colostro.....	46
3.5 Análise citológica qualitativa: contagem diferencial dos leucócitos do colostro.....	47
3.6 Atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino	48
3.6.1 Ensaios para avaliar a atividade bactericida	48
3.6.2 Obtenção e separação dos fagócitos do colostro bovino	49
3.6.3 Viabilidade dos fagócitos.....	50
3.6.4 Linhagem de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ECET) e padronização da concentração bacteriana.....	51
3.6.5 Dosagem das imunoglobulinas do colostro bovino e fonte de opsoninas	52
3.6.6 Opsonização e fagocitose da ECET.....	53
3.6.7 Avaliação da atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino para a ECET	55

3.6.7.1 Padronização da técnica de “Atividade Bactericida dos Fagócitos do Colostro Bovino”.....	55
3.6.7.2 Descrição da técnica padronizada	56
3.6.8 Análise estatística	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Análise citológica quantitativa: contagem total dos leucócitos do colostro bovino	61
4.2 Análise citológica qualitativa: contagem diferencial dos leucócitos do colostro bovino.....	63
4.2.1 Valores relativos	63
4.2.2 Valores absolutos	65
4.3 Concentração de imunoglobulinas do colostro bovino	68
4.4 Atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino	71
4.5 Relação entre a atividade bactericida indireta dos fagócitos e os outros componentes imunológicos do colostro	73
5 DISCUSSÃO	75
5.1 Citologia do colostro bovino	76
5.1.1 Análise citológica quantitativa: contagem total de leucócitos do colostro bovino	77
5.1.2 Análise citológica qualitativa: valores relativos dos diferentes tipos leucocitários do colostro bovino.....	78
5.2 Concentração de imunoglobulinas do colostro bovino	81
5.3 Atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino para a ECET.....	84
5.4 Relação entre a atividade bactericida indireta dos fagócitos e os outros componentes imunológicos do colostro	87
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é constituído por 204.512.737 animais, e 20.022.725 são vacas destinadas à exploração leiteira, produzindo o volume total de 23.474.694.000 litros de leite ao ano, destinados à alimentação humana “in natura” e fabricação de derivados lácteos (IBGE, 2004).

O desempenho de qualquer sistema de produção de leite está diretamente relacionado às condições sanitárias do rebanho. A criação de bezerros constitui a fase mais crítica e determinante sobre o futuro de uma exploração leiteira. O bezerro neonato é especialmente vulnerável, devido a sua relativa incapacidade de manter a temperatura corpórea e sua menor competência imunológica (RADOSTITS et al., 2007).

Em bezerros não há passagem de anticorpos por via transplacentária durante a gestação, além disso, o recém-nascido é subitamente transferido de um ambiente estéril para um ambiente povoado de microorganismos, expondo-se a diferentes agentes microbianos, alguns dos quais potencialmente patogênicos. Neste período, devido à imaturidade do sistema imune do neonato, o fornecimento adequado de colostro é necessário para prevenir doenças neonatais. A transferência de imunidade do colostro ao neonato é chamada de “transferência de imunidade passiva” (TIZARD, 2002).

A falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) pode ser provocada por diversos fatores, relacionados principalmente à qualidade imunológica, ingestão e absorção inadequada do colostro fornecido, tornando o neonato susceptível a várias enfermidades, como diarréias, broncopneumonias, afecções umbilicais e septicemias bacterianas (SMITH, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

Vários estudos (LAMOTTE; EBERHART, 1976; LOMBARDO, 1979; MILLER, 1983; STOOT; FELLAH, 1983; TYLER et al., 1989; RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1990; RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1991; RIEDEL-CASPARI et al., 1991; BENESI, 1993; BESSER, 1993; BESSER; OSBORNE, 1993; RIEDEL-CASPARI, 1993; STEINHARDT et al., 1993; ALDRIDGE; McGUIRE; LUNN, 1998; MENGE et al.,

1998; ROTHKÖTTER; PABST; BALEY, 1999; PABST; ROTHKÖTTER, 1999; PFISTER et al., 2000; HAGIWARA et al., 2001; FEITOSA et al., 2001; ROKKA et al., 2001; PARRENO et al., 2004; BROOKS et al., 2006) mostraram a importância da transferência de imunidade passiva aos bezerros neonatos, porém, alguns mecanismos envolvidos nesta proteção ainda são parcialmente compreendidos.

Devido à alta concentração de imunoglobulinas no colostro bovino foram desenvolvidos suplementos imunológicos a partir deste alimento, para o tratamento ou prevenção da falha na transferência de imunidade passiva e prevenção das doenças neonatais, porém a sua eficácia na substituição do colostro fresco ou congelado ainda é bastante discutida na literatura (SMITH, 2006; RADOSTITS et al., 2007). Alguns trabalhos mostraram que a administração oral dos suplementos não foi suficiente para a transferência de imunidade ao neonato, pois os teores de imunoglobulinas no sangue dos bezerros após sua ingestão do suplemento foi inferior a 100mg/mL, abaixo do recomendado para excluir a presença da FTIP (MEE et al., 1996; SMITH; FOSTER, 2007).

Além da utilização do colostro bovino para estabelecer a imunidade de animais neonatos, a literatura cita a sua utilização na prevenção de doenças em humanos (HE et al., 2001).

Na espécie bovina há diversos estudos avaliando a importância das imunoglobulinas do colostro no sistema imune dos bezerros neonatos, porém as pesquisas relacionadas à função dos leucócitos do colostro na imunidade neonatal, ainda são escassas (RIEDEL-CASPARI, 1993).

A hipótese da transferência de imunidade celular pelo colostro surgiu após a observação da presença de linfócitos maternos marcados na circulação sanguínea de leitões, duas horas após a ingestão de colostro contendo células marcadas. Aparentemente as células penetravam entre as células epiteliais no duodeno e íleo. Estes animais apresentaram maior resposta imunológica em comparação ao grupo controle (TIZARD, 2002).

A administração de colostro com e sem células foi comparada quanto à sua capacidade de proteger bezerros neonatos contra a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Os animais que receberam colostro com células excretaram menos bactérias que animais que receberam colostro congelado (sem células), e a resposta imunológica dos bezerros que receberam colostro com células, através de avaliação “in vitro”, foi significativamente maior que o grupo de

animais que receberam o colostro sem células (TIZARD, 2002). No entanto, a infecção intestinal de bezerros neonatos geralmente é causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), que possui fatores de virulência diferentes daqueles produzidos pela EPEC, porém, não foram encontrados estudos sobre a atividade dos fagócitos do colostro contra a ETEC.

A colibacilose causada pela ETEC afeta principalmente animais com menos de duas semanas de idade. Esta enfermidade é responsável por sérios danos econômicos para criadores de gado bovino, no Brasil e em outros países, pois os animais que sobrevivem a esta doença não apresentam o mesmo desenvolvimento quando comparados àqueles que se mantiveram livres da doença (UGRINOVICH et al., 2002).

A *Escherichia coli* é o microrganismo mais abundante da microbiota intestinal dos bezerros; e como anaeróbio facultativo, desempenha um importante papel na manutenção das funções fisiológicas normais de seus hospedeiros. No entanto, é também um importante patógeno e algumas cepas desenvolveram a capacidade de colonizar, invadir e produzir toxinas. A ETEC age fundamentalmente no intestino delgado pelos mecanismos de aderência, colonização e produção de toxina, que são os fatores essenciais para instalação do desequilíbrio hidro-eletrolítico e geração de diarreia. A fixação da bactéria nas células das vilosidades intestinais ocorre através de suas fímbrias. A patogênese da diarreia causada pela ETEC é similar a da cólera, pois a bactéria uma vez aderida ao epitélio intestinal, produz toxina e estimula a secreção local de eletrólitos e água para a luz intestinal. A proteção contra a colibacilose só tem lugar quando os anticorpos colostrais, principalmente das classes IgA e IgG1, são ingeridos pelos bezerros recém-nascidos (MARGATHO; AVILA, 2003).

Devido à escassez de pesquisas relacionadas à atividade funcional dos leucócitos do colostro, associada à importância da ECET como agente causador de diarreia em bezerros neonatos, os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- a) contagem total dos leucócitos do colostro bovino;
- b) Contagem diferencial dos leucócitos do colostro bovino;
- c) atividade bactericida dos fagócitos mononucleares e polimorfonucleares do colostro bovino contra a ECET;
- d) Concentração de imunoglobulinas do colostro bovino e sua relação com a atividade bactericida dos fagócitos mononucleares e polimorfonucleares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura sobre a contagem total e diferencial dos leucócitos, os teores de imunoglobulinas e a atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino ainda é escassa. O conhecimento sobre tal assunto é fundamentado na imunologia básica, mimetizando os mecanismos imunológicos dos fagócitos do sangue e leite bovino ou humano, para o colostro de animais da espécie bovina. A seguir serão apresentadas as informações obtidas através de revisão literária sobre o assunto estudado.

2.1 Contagem Total dos Leucócitos do Colostro Bovino

A população de células do leite é constituída por leucócitos e células epiteliais descamativas da glândula mamária, compondo o que Prescott e Breed (1910) denominaram *body cells* e Paape et al. (1963) de células somáticas, terminologia que veio a ser consagrada.

A contagem de células somáticas (CCS) representa a quantidade total de células presentes no leite, cuja alteração pode indicar uma condição fisiológica da glândula mamária, como o estágio de lactação (SCHALM; LASMANIS, 1968).

A glândula mamária passa por alterações fisiológicas durante sua fase produtiva, que se adequam às necessidades de cada fase da lactação. No final da gestação, prepara-se para a secreção do colostro, o qual apresenta características secretórias específicas para suprir as necessidades nutritivas e imunológicas do recém-nascido. Após a fase colostrar, a produção de leite aumenta gradativamente até atingir o pico de lactação, estabiliza-se por algum tempo, voltando a decrescer no final da lactação. Geralmente, este ciclo fisiológico da lactação dura um período de 280 a 305 dias (RADOSTITS et al., 2007).

No início e final da lactação ocorre aumento da celularidade do leite devido a

uma maior descamação celular associada a uma menor produção de leite (SCHALM et al., 1971; SCHULTZ, 1977; DAHOO; MEEK, 1982).

Mc Donald e Anderson (1981) estudaram a contagem de células somáticas na secreção láctea de três vacas Holandesas durante o período seco, e encontraram valor médio de células correspondente a $2,5 \times 10^6$ células/mL de colostro, no vigésimo quinto dia antes do parto, que diminuiu até atingir o valor médio de $0,6 \times 10^6$ células/mL, logo após o parto.

Jensen e Eberhart (1981) estudaram a secreção láctea provenientes de 52 quartos mamários, durante o início do período seco até o período pós parto. Os retro-referidos autores encontraram média geométrica de $0,36 \times 10^6$ células/mL no último dia de lactação das vacas; $18,0 \times 10^6$ células/mL após sete dias do início da secagem, diminuindo para $0,28 \times 10^6$ células/mL após seis dias do parto.

Raimondo (2006) e Estrella (2001) avaliaram a contagem total de leucócitos do colostro bovino e encontraram valores médios de $1,35 \times 10^6$; $0,578 \times 10^6$ células/mL de colostro, no primeiro dia pós-parto de vacas da raça Jersey, e nos primeiros três dias de lactação de animais da raça Holandesa, respectivamente, criadas no Estado de São Paulo, Brasil.

2.2 Contagem Diferencial dos Leucócitos do Colostro Bovino

Schalm et al. (1971) descreveram na secreção láctea de vacas a presença de dois grupos de células epiteliais (vacuolizadas e não vacuolizadas), neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, grande célula escamosa, além da presença de debris de células epiteliais, núcleos livres e corpúsculos de colostro, também denominado de corpúsculos de Niessen. Esse último, apenas na fase colostrada da secreção láctea. Esses autores, compilando a literatura da época, consideraram as células epiteliais como predominantes no leite normal.

As células nucleadas mais abundantes no colostro de vacas híidas são macrófagos, que atuam na fagocitose de bactérias e fungos, e possuem interação com linfócitos através de citocinas produzidas por eles (SMITH; GOLDMAN, 1968).

Poucos autores analisaram a contagem diferencial de leucócitos da secreção láctea de vacas pela técnica de citocentrifugação, Lee et al. (1980), Jensen e Eberhart (1981) e Östensson (1993) justificaram a importância do exame diferencial das células do leite de bovinos na interpretação da condição inflamatória, pois a presença ou predomínio de uma determinada célula representaria a necessidade específica da função celular por ela exercida. Östensson (1993) procurou em suas pesquisas determinar possíveis variações que pudessem ocorrer durante a lactação, nas diferentes fases dessa ou entre as ordenhas.

Em bovinos, todos os tipos de células envolvidas na resposta imune estão presentes na glândula mamária nos diferentes estágios de gestação. No início da gestação tem-se um aumento nos números de células epiteliais, linfócitos T e macrófagos, logo após, observa-se aumento nos números de linfócitos B secretores de imunoglobulinas de classe A, porém, pouco se sabe sobre a atividade funcional destas células (SALMON, 1999).

Os linfócitos T do colostro bovino apresentam fenótipo de célula de memória e, podem representar um mecanismo alternativo de proteção para o recém-nascido, devido à competência imunológica materna (TAYLOR et al., 1997). No entanto, os neutrófilos presentes no leite representam a primeira linha de defesa contra patógenos causadores de mastite na vaca; possui receptores específicos para bactérias Gram negativas, conhecidos como CD14. A interação entre lipopolissacarídeo (LPS) e CD14 provocam a liberação de fator de necrose tumoral α

(TNF α), que resulta na neutralização da LPS e recrutamento rápido de células polimorfonucleares ao sítio inflamatório (PAAPE et al., 2003).

Mc Donald e Anderson (1981) afirmaram que na secreção láctea de vacas holandesas, nos últimos 25 dias do período seco, há um predomínio de macrófagos e linfócitos. Cinco dias antes do parto observaram diminuição na quantidade de linfócitos, e logo após o parto, verificaram que todas as células da secreção eram macrófagos, e os neutrófilos polimorfonucleares estavam em pequeno número ou ausentes em todas as secreções avaliadas. A quantidade de linfócitos observada foi inferior a $0,05 \times 10^6$ linfócitos/mL de colostro durante os oito primeiros dias de lactação. A quantidade excessiva de macrófagos presentes na secreção colostrar foi justificada pela migração destas células através do tecido conectivo da glândula mamária para a secreção láctea. Além disso, afirmaram que a pequena quantidade de neutrófilos na secreção láctea durante o período seco e início da lactação poderia ser a justificativa para a susceptibilidade da glândula mamária durante este período.

Jensen e Eberhart (1981) encontraram predomínio de macrófagos na secreção láctea durante o período seco e início da lactação. Inicialmente encontraram uma maior proporção de neutrófilos no início do período seco, que diminuiu com o avançar do período de secagem e início da lactação subsequente. No entanto, a quantidade de linfócitos aumentou durante o período de secagem e início da próxima lactação. Os mesmos retro-referidos autores encontraram um maior número de leucócitos, pelo aumento na quantidade de neutrófilos, macrófagos e linfócitos na secreção láctea de vacas com infecção intramamária.

Dulin; Paape e Weinland (1982) avaliaram leite de vacas, observando predomínio de polimorfonucleares neutrófilos, seguidos de macrófagos, linfócitos e monócitos.

Miller; Paape e Fulton (1991) avaliaram a secreção colostrar de vacas primíparas e observaram valores médios relativos de 39,4; 16,5; 33,0; e 10,8%, respectivamente, de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células epiteliais, na segunda semana pós-parto.

Barrington e Parish (2001) citaram que o colostro bovino possui mais que 30% de linfócitos, que migrariam para a glândula mamária a partir do linfonodo mesentérico.

Além da espécie bovina, a citologia do leite foi analisada usando a citocentrifugação por Della Libera (2002) em vacas bubalinas, e por Madureira

(2006) em fêmeas caprinas. Em humanos os leucócitos predominantes no colostro são os macrófagos e neutrófilos (59%), seguidos pelos linfócitos (40%) (ISLAM et al., 2006).

2.3 Imunoglobulinas do Colostro Bovino

Os estágios de desenvolvimento da glândula mamária são constituídos pela mamogênese, colostrogênese, lactogênese, lactação e involução (BARRINGTON; PARRISH, 2001). A transferência de imunoglobulinas da circulação materna para a glândula mamária no período pré-parto é chamada de colostrogênese.

Durante a colostrogênese, grandes quantidades de IgG1 sanguínea são transferidas para a glândula mamária através de processo de transporte seletivo entre o epitélio mamário para o lúmen alveolar. Da mesma maneira, porém em menores quantidades, as IgG2 são transportadas (LARSON, 1980). No entanto, as imunoglobulinas M e A do colostro são provenientes de células situadas em regiões adjacentes ao parênquima mamário (LASCELLES, 1979).

A passagem de substâncias da circulação e líquido intersticial para o lúmen alveolar ocorre através de pinocitose com liberação de vesículas pelas células epiteliais da glândula mamária ou através do espaço intersticial. As vesículas aparecem inicialmente na porção basal das células e progridem até alcançar o lúmen alveolar. No entanto, a grande quantidade de IgG1 no colostro bovino sugere a existência de receptores específicos (Fc-specific) desta imunoglobulina na membrana basal e intersticial das células epiteliais alveolares, facilitando o transporte de vesícula contendo essas imunoglobulinas para o lúmen alveolar, com perda de porções citoplasmáticas das células envolvidas neste processo (Figura 01) (LASCELLES, 1979).

Fonte: (LASCELLES, 1979)

Figura 01 - Modelo esquemático para demonstrar o transporte seletivo de IgG1 e IgG2 entre o epitélio e o lúmen alveolar da glândula mamária

A colostrogênese é regulada por hormônios lactogênicos. Estrógeno e progesterona são fundamentais para o início da transferência da IgG1 para o colostro, através dos receptores, porém o aparecimento destes é estimulado pela ação da prolactina. No entanto, trabalhos sobre a regulação da colostrogênese ainda são escassos, e muitos mecanismos moleculares envolvidos neste processo, ainda são desconhecidos (BARRINGTON et al., 2001).

Durante o período de colostrogênese, aproximadamente 500g/semana de IgG são transferidas para a glândula mamária (BARRINGTON et al., 2001).

Existem três tipos de imunoglobulinas presentes no colostro: IgG (70-80%), IgM (10-15%) e IgA (10-15%), correspondendo a 100 a 700 mg/dL de IgA, 300 a 1.300 mg/dL de IgM, e 3.400 a 8000mg/dL de IgG. Cada uma tem uma função. A IgG tem a função principal de identificar e destruir possíveis patógenos. A IgM serve como primeira defesa nos casos de septicemia e a IgA protege as mucosas, como a

parede do intestino, ligando-se à parede intestinal e evitando a adesão de possíveis patógenos à mucosa. Portanto, o efeito da IgA perdura enquanto o bezerro estiver consumindo colostro, pois ela atua na parede interna do intestino (TIZARD,2002).

Vaz et al. (2004) obtiveram valores de 2.719 a 8.850mg/100mL de imunoglobulinas do colostro bovino através de mensuração indireta pela turbidez com sulfato de zinco.

Soares Filho et al. (2001) estudaram a concentração de imunoglobulinas da classe G no colostro bovino de primeira ordenha de vacas holandesas, utilizando a técnica de imunodifusão radial e obtiveram valor de 154,83 mg/mL.

A concentração de imunoglobulinas do colostro foi mensurada através da técnica de imunodifusão radial por Devey-Pocius e Larson (1983), que verificaram valores médios de 1.450, 1.430, 1.840, 2.190, e 1.860 mg/dL de IgG1; 380, 340, 390, 380 e 370 mg/dL de IgG2; 310, 340, 310, 360, e 330 mg/dL de IgM, e 47, 29, 43, 48, 52 mg/dL de IgA, respectivamente, em vacas com 01, 02, 03, 04 ou acima de 04 partos.

Muller e Ellinger (1981) mostraram diferença entre a quantidade de imunoglobulinas produzidas por vacas de diferentes raças, além disso, os autores observaram porcentagens de 73,7; 18,0; e 8,3% de imunoglobulinas das classes G, A e M, respectivamente, para as vacas da raça Holandesa.

O fator etário possui influência sobre a maturidade linfocitária e a quantidade de imunoglobulinas produzida e liberada no colostro (DEVERY-PONCIUS, 1983). Além disso, a raça também é um importante fator fisiológico envolvido com a quantidade de anticorpos do colostro (MILLER; ELLINGER, 1981).

A concentração de imunoglobulinas é maior no início da lactação e diminui com a realização de ordenhas sucessivas (OYENIYI; HUNTER, 1978). Ou seja, a maior absorção de imunoglobulinas do colostro pelo bezerro neonato, coincide com o período de maior qualidade imunológica do alimento, que ocorre nas primeiras doze horas pós-parto (SMITH, 2006).

A importância biológica das imunoglobulinas (Igs) do colostro fez com que alguns pesquisadores desenvolvessem suplementos orais para bezerros, contendo Igs específicas para a diarreia neonatal provocada pela ECET F5, diminuindo a ocorrência de diarreia na primeira semana de vida, na dependência da concentração de imunoglobulinas do suplemento (MEE et al., 1996; PFISTER et al., 2000). Outros pesquisadores estão verificando a eficácia da vacinação de vacas prenhes contra

Escherichia coli entero-invasiva e enterotoxigênica, com vistas à produção de anticorpos colostrais específicos (TYLER et al., 1989; ROKKA et al., 2001; ASCON et al., 2005; XU et al., 2006).

Os suplementos a base de imunoglobulinas do colostro bovino também estão sendo utilizados para prevenção e tratamento de doenças em humanos, principalmente para diminuir a ocorrência de diarreia em crianças (HE et al., 2001; BROOKS et al., 2006).

2.4 Atividade Bactericida dos Fagócitos Mononucleares e Polimorfonucleares do Colostro Bovino e sua Relação com a Concentração de Imunoglobulinas do Colostro Bovino

A diarreia causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET) representa uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em bezerros neonatos. A frequência de diarreia causada pela ECET é mais elevada nos primeiros dias de vida, e diminui nas faixas etárias superiores (NAGY; FEKETE, 1999).

Os mecanismos patogênicos da ECET têm sido alvo de muitos estudos, uma vez que a simples aderência da bactéria à mucosa intestinal seria suficiente para causar doença após um período de apenas algumas horas, com uma secreção intensa de fluídos e eletrólitos, associada a uma diminuição da absorção, a ponto de ser uma das principais causas de mortalidade de bezerros por desidratação e conseqüente acidose metabólica (MOON, 1978).

As mucosas do trato gastrointestinal são portas de entrada da maioria das infecções e atuam como uma barreira entre o ambiente interno e externo. Através da alimentação microorganismos nocivos entram em contato com o organismo animal, no entanto o estado de doença só se estabelece, quando há desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro (HONÓRIO, 1998).

Durante o processo evolutivo, vários mecanismos de defesa natural foram selecionados para as mucosas, dentre os quais aqueles inespecíficos, como o movimento peristáltico, as enzimas e a flora normal. Algumas regiões da mucosa digestiva apresentam estruturas altamente especializadas, conhecidas como “GALT” (*gut associated lymphoid tissue*). Esses são constituídos por células imunocompetentes infiltrantes das mucosas e estruturas distribuídas por toda a

superfície, como as placas de *Peyer* e os linfonodos mesentéricos, povoados por células de diversas populações com as mais variadas funções, inclusive a de produção de anticorpos secretores (MESTECKY; MCGHEE, 1987), mas em bezerros neonatos este mecanismo só é ativo após 37 dias de vida (ALDRIDGE; GUIRK; LUNN, 1998).

Em humanos a primeira barreira específica contra a instalação da *Escherichia coli* na mucosa intestinal é a imunoglobulina (Ig) de classe A, que previne a aderência destes microorganismos à mucosa intestinal, por possuir a capacidade de se ligar a eles e aos seus receptores presentes na membrana plasmática dos enterócitos. Em bovinos a Ig G assume o papel da IgA na imunidade da mucosa intestinal dos bezerros neonatos (RADOSTITS et al., 2007).

Vários pesquisadores ressaltam a importância das células provenientes do colostro na imunidade da mucosa intestinal, principalmente linfócitos, pois estão envolvidos na produção de imunoglobulinas, que impedem a ligação da ECET ao enterócito do hospedeiro (ROTHKÖTTER; PABST; BAILEY, 1999; SALMON, 1999).

Pitt et al. (1977) administraram substituto lácteo, suplementado com leucócitos colostrais e, verificaram que os mesmos protegeram ratos neonatos da enterocolite necrotizante fatal, após infecção oral com *Klebsiella pneumoniae*. No mesmo experimento, observaram que o colostro congelado, sem células vivas, não foi suficiente para proteger um segundo grupo de neonatos contra infecções.

Riedel-Caspari e Schmidt (1991a) citaram que os leucócitos presentes no colostro são células viáveis, geralmente representados por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, que podem atravessar a mucosa intestinal e atingir a circulação do neonato, após a ingestão do colostro, como evidenciado em humanos e ratos. A absorção dos fagócitos pode estar relacionada com o transporte de imunoglobulinas à circulação sanguínea de neonatos. Além disso, os leucócitos do colostro exibem capacidade de uma variedade de atividades imunológicas “in vitro” como: blastogênese, mitogênese, fagocitose e citotoxicidade, após estimulação antigênica. No entanto, o conhecimento sobre o significado da atividade celular na proteção contra infecções neonatais ainda é limitado.

Riedel-Caspari e Schmidt (1991b,c,d,e) utilizaram quatro grupos experimentais compostos por 16 bezerros cada. O Grupo COL + que recebeu

colostro completo; o grupo COL – que recebeu colostro sem leucócitos; o grupo MS+ que recebeu substituto lácteo suplementado com leucócitos do colostro, e o grupo MS- recebeu apenas substituto lácteo. Os autores verificaram que os animais dos grupos COL + e COL – não apresentaram diferenças quando se comparou o número de linfócitos no sangue analisado no segundo dia de vida; tiveram igual resposta à blastogênese induzida pela concoalina A. No entanto, o grupo COL + apresentou: maior quantidade de anticorpos contra hemácias de ovinos; maior proliferação espontânea de células mononucleares; maiores concentrações de anticorpos específicos contra *Escherichia coli*, principalmente IgG; maiores concentrações de neutrófilos atividade de suas enzimas lisossomais e resposta à fagocitose de *Streptococcus agalactiae*; a atividade bactericida para a *Escherichia coli* também foi maior no grupo COL +. Os animais que receberam substituto do colostro suplementado com leucócitos colostrais (MS +) apresentaram menor resposta imunológica em relação aos parâmetros avaliados, quando comparados aos animais que receberam colostro (COL + e COL -), porém, mostraram maior resposta imunológica quando comparado aos animais que receberam apenas substituto lácteo (MS-).

Riedel-Caspari (1993) verificou a atividade bactericida dos leucócitos colostrais em 20 bezerros infectados experimentalmente com *Escherichia coli* enteropatogênica (ECEP), três horas após o nascimento e, forneceram “pool” de colostro sem leucócitos a um grupo constituído por 10 animais, logo após a infecção e nos dois dias subseqüentes; ao segundo grupo foi fornecido um “pool de colostro suplementado com leucócitos”. Nesta pesquisa, observaram que o segundo grupo excretara menos bactéria em suas fezes nas primeiras semanas pós-infecção, além de apresentarem maiores teores séricos de imunoglobulinas específicas (IgA e IgM) contra esta cepa bacteriana. O aumento das taxas séricas de imunoglobulinas específicas para ECEP sugerem que os linfócitos do colostro exercem atividade efetora, além de sua ação direta contra os patógenos.

Os fagócitos distribuem-se basicamente por dois sistemas hematopoiéticos complementares: sistema mielóide e mononuclear fagocitário. Os neutrófilos pertencem ao primeiro grupo e, os monócitos e macrófagos ao segundo. Apesar de serem células diferentes, estes fagócitos apresentam algumas características comuns, que os dotariam de mecanismos de citotoxicidade dependentes e independentes de oxigênio, utilizados após englobarem o antígeno bacteriano, para

provocarem a destruição deste patógeno (TIZARD, 2002).

A fagocitose é um dos principais mecanismos de destruição de bactérias. Esse mecanismo constitui uma das primeiras linhas de defesa contra as infecções. O reconhecimento da partícula ou microorganismo a ser englobado pelo fagócito inicia-se com a aderência destes a membrana celular. Esta interação pode ocorrer por meio de receptores específicos, sem a presença de outros fatores imunológicos. No entanto, o processo de fagocitose pode ser potencializado se o microorganismo for previamente opsonizado com proteínas (imunoglobulinas e componentes do sistema complemento) do sobrenadante do colostro (HONÓRIO, 1995).

A fagocitose depende da presença de receptores em toda a membrana celular das células fagocíticas, que se ligam às estruturas complementares das opsoninas distribuídas por toda a superfície da partícula ou microorganismo, resultando assim numa ligação progressiva, um mecanismo semelhante ao fechamento de um “zíper” (SEGAL; SOOTHILL, 1983; ABBAS; LICHTMAN, 2007).

A idade da vaca e o estágio de lactação são fatores que podem interferir na fagocitose de bactérias pelos neutrófilos, além da técnica laboratorial utilizada para realizar a análise. Foi verificado que os neutrófilos obtidos da secreção de vacas no período seco possuem atividade fagocítica 20% maior, que aquela de vacas lactantes (MILLER; PAAPE; DULIN, 1985).

A opsonização de bactérias do grupo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) com imunoglobulinas das classes G, A e M do colostro bovino, facilitou a fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos sangüíneos obtidos de vacas sadias, para o *S. aureus*, em estudo realizado por Barrio et al. (2003), utilizando aparelho de citometria de fluxo. Neste trabalho, as imunoglobulinas M e IgG2 foram mais eficientes na opsonização da *S. aureus*.

As células do sistema imune de bovinos expressam receptores para a IgG (BIANCHI et al., 1996). Foi comprovado que os neutrófilos expressam receptores principalmente para a IgG2, enquanto os monócitos e macrófagos para a IgG1 e IgG2. Não foi identificada a presença de receptores para a IgM nos fagócitos polimorfonucleares bovino, mas há evidências do seu envolvimento na opsonização de bactérias (GREWAL et al., 1978).

Estudos mostraram que IgA humana pode se ligar à receptores presentes em neutrófilos e monócitos bovino, porém a atividade opsonizante da IgA é pouco conhecida na atividade bactericida dos fagócitos, apesar de haver correlação

positiva entre a concentração desta imunoglobulina e fagocitose do *S.aureus* causador de mamite bovina (GUIDRY et al., 1980; MILLER et al., 1988).

A imunoglobulina predominante no colostro bovino é a IgG1, e parece não mediar a fagocitose dos neutrófilos, através da opsonização de bactérias (MCGUIRE et al., 1979; HOWARD et al., 1980). Ao contrário, a IgG2 foi considerada importante opsonina para preceder a fagocitose (WATSON, 1976; LASCELLES, 1979), porém, a IgM foi considerada a melhor opsonina para a atividade fagocítica de neutrófilos polimorfonucleares contra a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (WILLIAMS; HILL, 1982).

Miller et al. (1988) estudaram a relação entre a concentração de imunoglobulinas no leite e a fagocitose de neutrófilos do sangue de bovinos. As correlações obtidas entre a porcentagem de fagocitose e cada isótipo de Igs foram de 0,33 a 0,60 IgM; -0,16 a 0,43 IgG1; 0,04 a 0,46 IgG2; e -0,30 a 0,36 IgA, demonstrando que a IgM e IgG2 apresentaram maior correlação com os índices de fagocitose.

A atividade fagocítica dos neutrófilos no sangue é maior que no leite, pois a fagocitose de glóbulos de gordura e caseína, que resultam na formação de fagolisossomos, recobertos por porções da membrana celular, reduzem a formação de pseudópodes e movimentos de rolamento celular. A menor disponibilidade de lisossomos provoca diminuição da atividade fagocítica e bactericida destas células (PAAPE et al., 2003).

Após a fagocitose, macrófagos e neutrófilos iniciam a mobilização dos mecanismos bactericidas dependentes e independentes de oxigênio (POUTREL, 2000). Os mecanismos independentes de oxigênio empregam alterações bactericidas de pH nos fagolisossomos (junção da partícula englobada e enzimas lisossômicas no citoplasma do fagócito) e enzimas lisossômicas como: proteases, ácido ribonuclease, β galactosidase e fosfolipases (PAAPE et al., 1991).

Os mecanismos dependentes de oxigênio envolvem oxidação via mecanismo denominado de “explosão respiratória” (“*respiratory burst*”). Durante este processo, são formados radicais de oxigênio que atuam como potentes toxinas para lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que constituem a parede da célula bacteriana (TIZARD, 2002).

A explosão respiratória inicia-se com a ativação da Nicotinamida-Adenosina-Difosfato (NADPH) oxidase, localizada na membrana celular do leucócito, que

converte o oxigênio (O_2) molecular do tecido circundante em superóxido (O_2^-). A NADPH doaria elétrons a partir da ativação da via glicolítica das hexoses-monofosfato. Este rápido consumo de oxigênio seguido da formação do superóxido é referido como aceleração respiratória. O superóxido converte-se em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido desmutase (SOD). Em presença da enzima catalase predominante em macrófagos maduros, descreveu-se a geração do radical hidroxila (OH^-), o oxigênio singleto (1O_2), cloraminas e aldeídos. Nos polimorfonucleares neutrófilos a principal via enzimática é a da mieloperoxidase, enzima lisossômica liberada no fagolisossoma, sendo os íons de peróxido e cloreto convertidos em ácido hipocloroso com atividade bactericida (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A investigação da atividade bactericida dos fagócitos “in vitro” pode ser realizada por meio de abordagem direta, verificando-se o decréscimo da viabilidade das bactérias em ensaios fagocitários, ou indireta, medindo produtos metabólicos celulares associados a esta atividade (BUESCHER; MCLLHERAN, 1993).

Os métodos de avaliação indireta da atividade bactericida dos fagócitos baseiam-se na detecção de produtos do metabolismo oxidativo. Destacam-se entre eles os que verificam o consumo de oxigênio e os que quantificam produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (PICK; MIZEL, 1981).

Pontes (1999) detectou maiores concentrações de peróxido de hidrogênio em ensaios contendo fagócitos e *Salmonella typhimurium*, quando comparado aos ensaios contendo apenas fagócitos do colostro humano, mostrando atividade bactericida dos fagócitos do colostro para a retro-referida bactéria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Devido ao fato de ser o estudo inicial desta linha de pesquisa, destinou-se muito tempo ao treinamento e padronização das técnicas laboratoriais, uma vez que o modelo originalmente proposto baseava-se em estudos em humanos, não conferindo resultados satisfatórios ao ser aplicado ao colostro bovino, razão pela qual foi necessária a adaptação da metodologia, além da transferência de alguns equipamentos do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, localizado na capital de São Paulo, para o Laboratório do Hospital Veterinário do *Campus* de Pirassununga da USP, próximo às fazendas utilizadas nesta pesquisa, nas quais eram albergadas as fêmeas doadoras de colostro, uma vez que o transporte das amostras até o Laboratório de Pesquisa, localizado em São Paulo, acarretava a perda de viabilidade dos fagócitos, em função do tempo de viagem, ao redor de três horas.

3.1 Animais utilizados

As amostras de colostro foram colhidas de quatro propriedades leiteiras localizadas no interior de São Paulo, que apresentavam diferentes condições sanitárias, principalmente quanto aos piquetes maternidade, tornando as vacas mais susceptíveis às mamites, comprovadas no isolamento bacteriano a partir das amostras colhidas de colostro. Todas as amostras positivas ao exame bacteriológico do colostro foram excluídas desta pesquisa, conforme delineamento experimental proposto.

Em função do grande número de isolamentos bacterianos nas três primeiras fazendas utilizadas, optou-se por selecionar uma quarta fazenda, com melhores condições sanitárias e de controle do rebanho, para continuar a colheita das

amostras e aumentar o aproveitamento das mesmas, optando-se pela seleção de fazenda produtora de leite tipo A. Além disso, nesta fazenda ocorre aproximadamente 05 partos/semana e três ordenhas diárias, aumentando a disponibilidade de colostro para a realização da pesquisa.

No projeto originalmente proposto seria realizada a análise de 100 amostras de colostro, provenientes dos quartos de 25 vacas da raça Holandesa, porém no decorrer da pesquisa houve a necessidade da colheita de amostras de um maior número de animais (n=53), para ser constituída a amostragem programada, pois algumas vacas apresentaram alteração ao exame físico da glândula mamária e do colostro, de acordo com critérios semiológicos estabelecidos por Dirksen et al. (1993), sendo também positivas no exame bacteriológico da secreção láctea, ou apresentavam insuficiente número de leucócitos viáveis para a execução das técnicas programadas para a avaliação da atividade bactericida dos fagócitos.

3.2 Obtenção das amostras individuais de colostro

As vacas e novilhas utilizadas para a colheita de colostro eram transferidas e alojadas no piquete maternidade com 245 a 250 dias de gestação, vacinadas com Rotatec-J5[®] (diarréia neonatal e mastite ambiental), Kevac[®] (ceratoconjuntivite infecciosa bovina) e Sintoxan[®] (clostridioses), sendo observadas diariamente.

Imediatamente após o parto eram separadas dos bezerros neonatos, e encaminhadas para a sala de ordenha, onde eram realizadas as colheitas das amostras. Uma outra vantagem na colheita das amostras na quarta fazenda, sendo prática da não mamada de colostro pelo bezerro por amamentação natural, pois assim possível, controlar o tipo de secreção láctea colhida, diferente das três primeiras fazendas, nas quais os bezerros ficavam com a mãe, e se o parto ocorresse à noite, o neonato poderia alimentar-se o período todo, antes da colheita das amostras, interferindo na sua qualidade e homogeneidade.

Nas três primeiras fazendas utilizadas, as amostras de colostro eram colhidas no piquete maternidade, por solicitação dos funcionários das criações, uma vez que os bezerros permaneciam com a mãe por pelo menos 24 horas pós-parto no retro referido piquete, para garantir a ingestão de colostro, através da amamentação

natural.

As amostras de colostro utilizadas na presente pesquisa foram colhidas antes da realização da primeira ou segunda ordenha pós-parto das vacas, na sala de ordenha (Figura 02), não ultrapassando essa colheita o período de doze horas pós-parto. Pretendia-se colher todas as amostras antes da primeira ordenha da vaca, mas por depender-se do aviso dos tratadores sobre o momento da parição, algumas amostras só puderam que ser colhidas antes da segunda ordenha.

a) Vista Interna da Sala de Ordenha da Fazenda Produtora de Leite do Tipo A

b) Vista Externa da Sala de Ordenha da Fazenda Produtora de Leite do Tipo A

Figura 02 – Vista interna e externa da sala de ordenha da fazenda produtora de leite tipo A - São Paulo - 2008

3.3 Método de colheita das Amostras de Colostro

Para colher as amostras de colostro, procediam-se a limpeza e desinfecção dos tetos, com uso de água e hipoclorito, secagem dos mesmos com papel toalha individual, e desinfecção dos orifícios dos tetos com etanol a 70%.

Inicialmente, colheu-se 50mL de colostro puro de cada quarto mamário, em tubos Falcon estéreis com capacidade de 50mL, para obtenção de células e avaliação da atividade bactericida dos fagócitos contra a ECET. Porém, no laboratório as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm a 4°C e, não se obteve a separação do colostro em três fases (“botão” celular, sobrenadante e camada de gordura), conforme desejado, em função da densidade colostrual. Como não era recomendável aumentar a força de centrifugação para se obter as três fases de separação, pois com isto poderia ser provocada a lise e queda na viabilidade celular, optou-se pela diluição do colostro, acrescentando-se 20 mL de PBS (Anexo 01) gelado a 20mL de colostro puro, totalizando um volume de 40mL de colostro diluído na proporção de 1:1. Esta preparação assim diluída foi centrifugada a 1500rpm a 4°C e obteve-se a separação das três fases desejadas: “botão” celular, sobrenadante e camada de gordura. A partir de então, optou-se pela colheita das amostras de colostro em tubos Falcon estéreis com capacidade para 50mL, contendo 20mL de PBS. Assim, antes da primeira ou segunda ordenha das vacas, eram colhidos 20mL de colostro, completando o volume de 40mL no interior do tubo Falcon, assim restando um espaço correspondente ao volume de 10mL do tubo para a retenção de oxigênio no interior do tubo, que era utilizado para a respiração e manutenção da viabilidade das células contidas no colostro, que foram utilizados na avaliação da atividade bactericida indireta dos fagócitos do colostro bovino para a ECET, constituindo esse volume de colostro a alíquota 01.

O número de células viáveis obtidas com a colheita de apenas um frasco da alíquota 01 (um) foi insuficiente para a realização de todos os ensaios programados para avaliar a fagocitose e atividade bactericida dos fagócitos para ECET, optando-se pela colheita de quatro frascos da alíquota 01 (um).

A segunda alíquota de colostro foi colhida em tubos Falcon estéreis com capacidade de 50mL, no qual foi adicionado 20mL de colostro puro, para análise citológica e obtenção das opsoninas do colostro.

A terceira alíquota do colostro foi colhida em tubos de vidro estéreis com capacidade de 5mL para a realização do exame bacteriológico do colostro.

As amostras foram transportadas até o laboratório sob refrigeração à aproximadamente 4°C, acondicionadas em caixa de material isotérmico imersas em gelo “moído”, uma vez que as células se mostraram sensíveis aos efeitos térmicos, reduzindo sua viabilidade. A temperatura de 4°C diminui a atividade das células, favorecendo a sobrevivência celular por maior período de tempo.

No laboratório, a segunda alíquota foi dividida sendo disposta em três frascos dentro da capela de esterilização, em condições de assepsia: 1mL de colostro em frasco de vidro com capacidade de 5mL, acrescido de 1mL de PBS, utilizados na análise citológica quantitativa da secreção láctea; 1mL de colostro em tubos Falcon com capacidade de 50mL, acrescidos de 49mL de PBS, para análise citológica qualitativa; e 10mL de colostro em tubos Falcon com capacidade de 15 mL, para a obtenção do soro colostrado, utilizado para a opsonização da ECET nos ensaios da atividade bactericida indireta dos fagócitos.

3.4 Análise Citológica Quantitativa: contagem dos leucócitos do colostro

Os leucócitos do colostro foram contados utilizando a técnica da contagem microscópica direta, porém ocorreram dificuldades durante a pipetagem do volume correspondente a 10 µl de colostro, pois este apresentava elevada densidade, que não permitia a aspiração do volume desejado, além de ocorrer o desprendimento do esfregaço lácteo distendido durante a coloração da lâmina. Para contornar estas dificuldades, o colostro foi diluído na proporção de 1:1 em PBS em tubos de vidro com capacidade de 5mL e, posteriormente distribuído em uma área de 01 (um) cm², em lâmina de vidro para microscopia, previamente limpa e desengordurada. Após 24 horas de secagem em temperatura ambiente, a lâmina foi imersa em metanol por 15 minutos para fixação (PRESCOTT; BREED, 1910), e a seguir coradas pela técnica de Rosenfeld padronizada em 1947 (Anexo 02). Para a avaliação do número de células, foram contados 100 campos microscópicos, utilizando-se microscópio óptico

comum com objetiva de imersão com aumento de 1000X. O resultado da contagem de cada amostra foi multiplicado pelo fator do microscópio e por dois em função da diluição inicial da amostra, obtendo-se o valor do número de células/mL de colostro. Durante a realização das contagens, os fagócitos foram diferenciados em mononucleares e polimorfonucleares.

3.5 Análise Citológica Qualitativa: contagem diferencial dos leucócitos do colostro

Para a análise citológica qualitativa do colostro, foi realizada contagem diferencial pela técnica da citocentrifugação (DELLA LIBERA, 2002). Foram adicionados 1mL de colostro em um frasco *Falcon* contendo 49 mL de PBS. As células foram separadas por centrifugação com força centrífuga relativa (FCR) igual a 1500 rpm, durante 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A centrifugação permitiu a separação do colostro em três fases nítidas: o “botão” celular, uma porção fluída intermediária (sobrenadante) e uma camada de gordura.

A camada de gordura e o sobrenadante foram desprezados. Dessa forma restou apenas o botão de células decantado no fundo do frasco. Subseqüentemente, este botão foi desprendido do frasco por aspersão, através da aplicação de fracos jatos de solução de tampão fosfato (PBS), sendo então homogeneizado, completando-se o volume com PBS refrigerado (refazendo o volume primitivo de 50 mL). A suspensão foi novamente centrifugada, nas condições já mencionadas, com o sobrenadante desprezado e, o botão de células ressuspensionado em um mL de meio enriquecido (RPMI 1640-GIBCO®), melhorando assim as condições de preservação.

Alíquotas de 200 µL da suspensão celular do colostro, preparadas como descrito anteriormente, foram submetidas a citocentrifugação (CITOSPIN, INCIBRAS®) a uma força centrífuga relativa (FCR) de 20 G durante seis minutos. Os esfregaços de colostro foram corados pelo método de Rosenfeld (1947) e, examinados em microscopia de campo claro, com aumento de 1000 X, observando-se os tipos celulares predominantes (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e

basófilos), e realizando-se assim a contagem diferencial das células do colostro bovino. Os resultados para os diferentes tipos celulares foram expressos em valores relativos (%)

3.6 Atividade Bactericida dos fagócitos do Colostro Bovino

Era proposta inicial que a população celular seria separada através da utilização de ficoll-paque em fagócitos mononucleares e polimorfonucleares. Porém, no desenvolvimento deste estudo verificou-se que o colostro bovino possui predomínio de células mononucleares, e somente aproximadamente 15% dos fagócitos são polimorfonucleares, encontrando-se dificuldade em separar esta minoria de células no daquelas presentes no colostro de vacas híidas, optando-se assim pela avaliação da atividade bactericida dos fagócitos sem separá-los em grupos celulares (mononucleares e polimorfonucleares).

3.6.1 Ensaios para avaliar a atividade bactericida

Para verificar a atividade bactericida dos fagócitos e a importância da opsonização prévia da bactéria, foram utilizadas células de colostro em presença de suspensão bacteriana previamente opsonizada ou não, com o sobrenadante do colostro. Foram utilizados os seguintes ensaios:

Ensaio Controle

- Realizado com o uso somente de suspensão de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares (C)

Ensaios Experimentais

- Realizados com a utilização de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares em suspensão de ECET não opsonizada (NO);

- Realizado com o uso de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares em suspensão de ECET previamente opsonizada em 10% de “pool” de sobrenadante de colostro bovino delipidado (O).

3.6.2 Obtenção e separação dos fagócitos do colostro bovino

Todos os procedimentos descritos neste tópico foram realizados assepticamente em capela de esterilização.

Os quatro tubos Falcon, contendo a alíquota 01 (um) de cada uma das amostras de colostro, foram centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos à 4°C. A centrifugação permitiu a separação do colostro em três fases nítidas: o “botão” celular, uma porção fluída intermediária e uma camada de gordura. A camada superior composta de gordura foram desprezadas, a porção fluída (sobrenadante) e, o botão celular foi conservado, ressuspendido em 40mL de PBS gelado e novamente centrifugado. Após a segunda centrifugação, novamente preservou-se apenas o botão celular e descartou-se o sobrenadante e camada de gordura.

O botão celular de cada um dos quatro tubos Falcon da alíquota 01 (um) de cada amostra, foi ressuspendido em 10mL de RPMI 1640 gelado. Após, juntou-se o conteúdo de todos os frascos da alíquota 01 (um) em apenas um tubo Falcon, totalizando um volume de 40mL. O tubo Falcon foi novamente centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular novamente ressuspendido em RPMI gelado. A quantidade de RPMI 1640 adicionada foi variável conforme o tamanho do botão celular obtido, pois muitas vezes foi impossível a contagem das células viáveis pelo grande número de células presentes, observando-se sobreposição celular e presença de restos celulares do colostro, necessitando de acréscimo de RPMI para uma diluição da suspensão celular.

As células viáveis da suspensão celular foram contadas em câmara hematómica de Neubauer.

3.6.3 Viabilidade dos fagócitos

A análise da viabilidade celular foi realizada nas suspensões celulares. Para tanto, foram adicionados 90 μL de azul de tripan a 0,1 %, em uma alíquota de 10 μL de cada suspensão celular. A seguir, foi realizada a contagem dos leucócitos do colostro em câmara hematómica de Neubauer, utilizando para tanto um reticulado dos quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos (área de 1mm^2 , subdividida em 16 quadrados menores com área de $1/16\text{ mm}^2$). A contagem foi realizada utilizando microscopia óptica de campo claro, com aumento de 400 vezes. O número total de células contadas em um retículo específico para contagem de leucócitos do hemocítômetro correspondeu à concentração celular e, sua unidade foi expressa em células/ mm^3 . Para converter o número de células contadas no resultado final expresso em células/mL, a seguinte fórmula foi utilizada: n° de células contadas x 10 x 10 x 1000, ou seja, multiplicou-se o número de células por 100.000 (10^5), que depois foi convertido para 10^6 (DELLA LIBERA, 2002).

As células que não adquiriram coloração azul foram consideradas viáveis, isto é, não se impregnaram com o corante (Figura 03), expressando o resultado em valor relativo, caracterizando o percentual destas células. A seguir o número relativo destas células foi transformado em valor absoluto, expressando-se esses valores em milhões/mL (DELLA LIBERA, 2002).

Figura 03 – Fagócitos viáveis do colostro bovino de segunda ordenha, não impregnados pelo corante azul de trypan - São Paulo - 2008

3.6.4 Linhagem de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET) e Padronização da Concentração Bacteriana

Para avaliar (“*in vitro*”) a atividade bactericida dos fagócitos do colostro, foi utilizada uma cepa de ECET do grupo F5 (K99), isolada de um bezerro com diarreia, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Tomomassa Yano do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Nos ensaios de fagocitose da ECET pelos fagócitos, foi utilizada a concentração de 2×10^7 bactérias, determinada através da contagem de unidades formadoras de colônia bacteriana (MEYNELL; MEYNELL, 1965). Foi realizado o cultivo da ECET F5 em meio de cultura BHI líquido (Anexo 03), incubado a 37°C durante 18 horas (suspensão bacteriana). A seguir, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 1.500 rpm durante 10 minutos, lavada duas vezes em solução salina tamponada para bactérias (PBS bactérias - Anexo 04), ajustando a suspensão bacteriana em espectrofotômetro para densidade óptica (D.O) de 0,2 em

comprimento de onda de 540 nanômetros. A seguir a suspensão bacteriana foi diluída seriadamente até 10^{-5} em capela de esterilização. A diluição seriada foi realizada pelo acréscimo de 100 μ L da suspensão bacteriana em 900 μ L de meio de cultura BHI líquido (10^{-1}), realizando nova diluição através do acréscimo de 100 μ L da suspensão bacteriana na concentração 10^{-1} em um outro tubo contendo 900 μ L de BHI líquido (10^{-2}), repetindo-se a diluição até completar a diluição 10^{-5} . Foram pipetados 10 μ L da diluição 10^{-5} em placas contendo agar sólido TSA (Anexo 05), que foram incubadas a 37°C durante 18 horas, para a realização da contagem do número de colônias bacterianas. O procedimento foi realizado 18 (dezoito) vezes, obtendo-se o número médio de 253 colônias bacterianas, que foram multiplicadas pela diluição (100.000) e pelo volume pipetado (10), obtendo o valor de $25,3 \times 10^7$ bactérias/mL da suspensão bacteriana inicial. Portanto, foi utilizado o volume de 80 μ L da solução bacteriana com densidade óptica de 0,2 a 540 nm, correspondente a concentração de 2×10^7 bactérias.

Dezoito horas antes da realização dos ensaios de fagocitose, a *Escherichia coli* F5, mantida em ágar semi-sólido (Anexo 06) em ausência de luz, foi repicada em tubos contendo 5mL de BHI líquido, e estes incubados em estufa a 37°C por 18 horas. Após este período, as bactérias foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada e inativada por uma hora a 60°C. A seguir, a concentração bacteriana foi ajustada com a utilização de espectrofotômetro, a 540 nanômetros e densidade óptica de 0,2 (D.O = 0,2), e reservadas para a opsonização e realização dos ensaios de fagocitose.

3.6.5 Dosagem das Imunoglobulinas do Colostro Bovino e Fonte de Opsoninas

O tubo Falcon estéril com capacidade para 15mL contendo 10mL de colostro puro foi centrifugado a 3.600 rpm durante uma hora. Após centrifugação, observou-se separação do colostro em três fases: camada superior de gordura, porção fluída (sobrenadante) e botão celular. O sobrenadante (soro do colostro) foi separado e acrescido em duplicatas em microtubos plásticos com capacidade para 3mL em

determinação das taxas de imunoglobulinas das classes IgG, IgM e IGA do colostro bovino através do método de imunodifusão radial simples utilizando Kit comercial “Radial Immunodiffusion (RID) Kits” da marca VMRD® (MANCINI et al., 1965). Foram utilizadas placas de agar incorporadas com anticorpos anti-imunoglobulina bovina G, M e A.

Um volume de 3 μ L do soro do colostro diluído foi pipetado e colocado em placas específicas para a determinação quantitativa de IgG, IgA e IgM. Em seguida, as placas preparadas foram incubadas por 18 a 24 horas em temperatura ambiente. A quantificação de imunoglobulinas foi realizada comparando-se a intensidade de reação das amostras (Figuras 04) com aquela obtida a partir do padrão de imunoglobulina com teor pré-estabelecido. As amostras que tiveram reações maiores que a sensibilidade do método foram novamente diluídas e reavaliadas. Os valores obtidos foram multiplicados pela diluição do soro do colostro.

Figura 04 – Reação do soro do colostro bovino na placa contendo ágar impregnado com anti IgG bovina - São Paulo - 2008

3.6.6 Opsonização e Fagocitose da ECET

Uma alíquota do soro do colostro foi utilizada para a opsonização da ECET,

realizada segundo a técnica descrita por Bellinati-Pires et al. (1989).

O soro do colostro de cada uma das amostras foi misturado com volumes apropriados de suspensão bacteriana em meio de cultura RPMI 1640, para concentrações finais de 2×10^7 bactérias/mL e 10% de opsoninas. Uma outra suspensão bacteriana foi preparada em meio de cultura RPMI, sem opsoninas, mantendo a concentração final de 2×10^7 bactérias/mL, para servir como suspensão controle contendo bactérias não opsonizadas (Quadro 1). Após 30 minutos de incubação a 37°C as suspensões bacterianas foram imediatamente utilizadas no ensaio de fagocitose das amostras de células do colostro.

	Tubo 1 (bactérias opsonizadas)	Tubo 2 (bactérias não opsonizadas)	Tubo 3 (Controle)
Suspensão Bacteriana	80µL (16%)	80µL (16%)	*****
RPMI	370µL (74%)	420µL (84%)	500µL
Opsoninas	50µL (10%)	*****	*****
Incubação	30 minutos		

Quadro 1 – Opsonização da ECET - São Paulo - 2008

Após o período de opsonização da ECET, volumes iguais de suspensão de bactérias (2×10^7 bactérias/mL) dos tubos 1 e 2, foram misturados separadamente com suspensão de células (2×10^6 células/mL) em tubos de plástico, com volume ajustado e padronizado de 500µL (Quadro 02). A suspensão da ECET opsonizada ou não, e as células foram incubadas por 30 minutos, sob agitação a 37°C, para que as células e as bactérias pudessem interagir e favorecer a fagocitose. Após esse período a suspensão contendo bactérias e células foram centrifugadas por 10 minutos, a 1.500rpm sob refrigeração a 4°C.

	Tubo 02 (O)	Tubo 02 (NO)	Tubo 03 (C)
Suspensão Bacteriana	80µL (16%)	80µL (16%)	*****
RPMI	370µL (74%)	420µL (84%)	500µL
Opsoninas	50µL (10%)	*****	*****
Suspensão Celular em RPMI	500µL	500µL	500µL
Incubação	30 minutos		

Quadro 2 – Fagocitose da ECET - São Paulo - 2008

3.6.7 Avaliação da atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino para ECET

3.6.7.1 Padronização da Técnica de Avaliação da “Atividade Bactericida dos Fagócitos do Colostro Bovino”

No projeto inicialmente proposto seria avaliada “in vitro” a atividade bactericida direta dos fagócitos do colostro bovino, pelo decréscimo da viabilidade dos microorganismos em ensaios fagocitários, ou seja, fundamentando-se na contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) em placas de cultura, observando-se o decréscimo no número de colônias microbianas após a fagocitose e destruição do patógeno.

Os protocolos inicialmente adotados foram os sugeridos por Honório (1995), que avaliou o colostro humano. Foram utilizados ensaios controles, e outros contendo fagócitos e ECET opsonizada ou não, com tempo de opsonização de 30 minutos, tempo de fagocitose de 30 minutos, e tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos para a atividade microbicida dos fagócitos, conforme delineamento experimental do material e métodos do projeto inicial. No entanto, os resultados obtidos após a

realização de 10 (dez) avaliações, mostraram maior número de colônias bacterianas com o avançar dos períodos de atividade microbica. Diante de tal resultado, pode-se concluir que a concentração de 2×10^7 bactérias viáveis utilizadas nos ensaios, estava alterando, pois estas bactérias estavam se replicando, e a proporção de fagócitos e bactérias (01 fagócito: 10 bactérias) estaria alterando-se no decorrer dos períodos de opsonização, fagocitose e atividade microbica direta dos fagócitos.

As mesmas dificuldades em encontrar resultados com a metodologia descrita por Honório (1995), foram observadas por Pontes (1999), que optou por adaptar a técnica de avaliação da atividade bactericida dos fagócitos do humano, através de metodologia indireta, mensurando o peróxido de hidrogênio produzido pelos fagócitos na presença de bactéria inativada, opsonizada ou não. A bactéria utilizada por Pontes (1999) foi a *Salmonella typhimurium*.

Diante das dificuldades encontradas e tentativas frustradas de padronizar a técnica de avaliação da atividade bactericida direta dos fagócitos pelo plaqueamento, optou-se por testar a técnica adaptada por Pontes (1999) para mensurar a atividade bactericida dos fagócitos dos colostro bovino para a ECET.

3.6.7.2 Descrição da Técnica Padronizada

A liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é quantificada pelo método de oxidação da peroxidase dependente de vermelho de fenol (PICK; KEISARI, 1980), adaptado para microensaio por Pick e Mizel (1981), modificado por Russo et al. (1989) e Pontes (1999).

Após a fagocitose da *Escherichia coli* F5 pelos fagócitos, as suspensões de células e bactérias (tubos 01 e 02), assim como o tubo contendo o controle (tubo 03) foram centrifugadas a 160G, sendo o sobrenadante desprezado para retirada do excesso de bactéria extracelular, e ressuspensos em solução de vermelho de fenol, contendo peroxidase, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, fosfato de cálcio e potássio, e água deionizada (Anexo 07). O controle contendo somente células foi realizado paralelamente para verificação da liberação espontânea do peróxido de hidrogênio pelas células na

ausência da ECET F5.

A curva padrão de peróxido de hidrogênio foi estabelecida a partir de concentrações molares conhecidas (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 nmoles de H_2O_2 /100 μl de solução de vermelho de fenol). A curva e o branco (solução de vermelho de fenol) foram incubados em placas ELISA A/2 de 96 poços, com um volume de 100 μl por alvéolo e as suspensões celulares incubadas em tubos plásticos do tipo Falcon estéril.

As placas e os tubos 01, 02 e 03 permaneceram em estufa a 37°C durante uma hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados e 100 μl /alvéolo do sobrenadante desses tubos foram colocados em duplicata nos poços das linhas A e E das placas de ELISA, já preenchidas com a curva e o branco (Quadro 3 e Figura 05). Houve a necessidade da realização de diluição seriada até 10^{-8} do sobrenadante dos tubos em solução de fenol vermelho, pois a concentração de água oxigenada foi maior que os valores da curva padrão. A concentração de H_2O_2 foi medida após adição de 10 μl de uma solução de NaOH 1N, por alvéolo, e a leitura feita em filtro 630 nm.

Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O.) foram transformados em nmoles de água oxigenada liberados por número de células utilizadas (2×10^6 células), mediante equação de regressão linear construída com base na curva padrão, multiplicado pela diluição do sobrenadante.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	0,5	2,0	C 1	NO 1	O1	C 2	NO 2	O2	C 3	NO 3	O3
B	B	0,5	2,0	C1 10 ⁻²	NO 1 10 ⁻²	O1 10 ⁻²	C2 10 ⁻²	NO 2 10 ⁻²	O2 10 ⁻²	C3 10 ⁻²	NO 3 10 ⁻²	O3 10 ⁻²
C	B	0,5	2,0	C1 10 ⁻⁴	NO 1 10 ⁻⁴	O1 10 ⁻⁴	C2 10 ⁻⁴	NO 2 10 ⁻⁴	O2 10 ⁻⁴	C3 10 ⁻⁴	NO 3 10 ⁻⁴	O3 10 ⁻⁴
D	B	0,5	2,0	C1 10 ⁻⁸	NO 1 10 ⁻⁸	O1 10 ⁻⁸	C2 10 ⁻⁸	NO2 10 ⁻⁸	O2 10 ⁻⁸	C3 10 ⁻⁸	NO 3 10 ⁻⁸	O3 10 ⁻⁸
E	B	1,0	4,0	C 1	NO 1	O1	C 2	NO 2	O2	C 3	NO 3	O3
F	B	1,0	4,0	C1 10 ⁻²	NO 1 10 ⁻²	O1 10 ⁻²	C2 10 ⁻²	NO 2 10 ⁻²	O2 10 ⁻²	C3 10 ⁻²	NO 3 10 ⁻²	O3 10 ⁻²
G	B	1,0	4,0	C1 10 ⁻⁴	NO 1 10 ⁻⁴	O1 10 ⁻⁴	C2 10 ⁻⁴	NO 2 10 ⁻⁴	O2 10 ⁻⁴	C3 10 ⁻⁴	NO 3 10 ⁻⁴	O3 10 ⁻⁴
H	B	1,0	4,0	C1 10 ⁻⁸	NO 1 10 ⁻⁸	O1 10 ⁻⁸	C2 10 ⁻⁸	NO2 10 ⁻⁸	O2 10 ⁻⁸	C3 10 ⁻⁸	NO 3 10 ⁻⁸	O3 10 ⁻⁸

Coluna 01 = Branco; Colunas 02 e 03 = Curva de água oxigenada a 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmol/2x10⁶ células; Coluna 04 = ensaio controle; Coluna 05 = ensaio NO (fagocitose com bactérias não opsonizadas); Coluna 06 = ensaio O (bactérias opsonizadas); 1/2/3 = número amostra; -2/-4/-8 = diluição do sobrenadante.

Quadro 3 – Modelo esquemático do preenchimento da placa ELISA A/2 com o sobrenadante de cada um dos ensaios realizados, para a avaliação indireta da ação dos fagócitos do colostro bovino contra a ECET. São Paulo, 2008.

Figura 05 - Placa de ELISA A/2 preparada para leitura em microleitor ELISA a 630 nanômetros - São Paulo - 2008

3.6.8 Análise estatística

Os resultados obtidos segundo as variáveis estudadas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

Os valores da contagem diferencial de leucócitos, as concentrações de imunoglobulinas e de peróxido de hidrogênio apresentaram distribuição paramétrica e foram submetidos à análise de variância e suas diferenças foram avaliadas pelo teste de Tukey (SAMPAIO, 1998).

Os valores da contagem total de leucócitos apresentaram distribuição não paramétrica, sendo calculadas as medianas de cada parâmetro avaliado, e suas diferenças obtidas através do teste de Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 1998).

Quando necessário foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre duas variáveis; estabelecida a regressão linear entre duas variáveis, e sua significância avaliada por meio de análise variância (SNEDCOR; COCKRAM, 1967). As análises foram processadas com o auxílio do programa estatístico computadorizado (MINITAB, 2000).

4 RESULTADOS

Das 212 amostras de colostro colhidas, 41 (19,3%) foram positivas ao exame bacteriológico, restando 171 (80,7%) amostras negativas (Gráfico 01). As amostras positivas ao exame bacteriológico foram excluídas da presente pesquisa, conforme critério descrito no material e métodos.

Gráfico 01 - Porcentagens de amostras positivas e negativas no exame bacteriológico do colostro bovino considerando a amostragem total - São Paulo - 2008

4.1 Análise citológica quantitativa: contagem total dos leucócitos do colostro bovino

Os valores medianos dos fagócitos obtidos, respectivamente, antes da primeira e segunda ordenha das vacas foram de $0,657$ e $0,828 \times 10^6$ leucócitos mononucleares, e de $0,178$ e $0,392 \times 10^6$ leucócitos polimorfonucleares/mL de colostro. O total de leucócitos do colostro obtido por contagem pela técnica de microscopia direta foi de $0,878 \times 10^6$ e $1,260 \times 10^6$ leucócitos totais/mL de colostro, antes da primeira e segunda ordenha respectivamente (Tabela 01, Gráfico 02 e Figura 06).

Comparando-se as contagens de leucócitos à primeira e à segunda ordenha, observou-se diferença na contagem de células polimorfonucleares (PMN), ocorrendo uma maior contagem na segunda ordenha, sendo o mesmo observado na contagem total de leucócitos ($P < 0,0001$ e $P < 0,002$; respectivamente). Na contagem de células mononucleares (MN) não ocorreu diferença entre as ordenhas realizadas ($P > 0,09$) (Tabela 1 e Gráfico 02).

Tabela 01 - Mediana dos valores absolutos dos leucócitos ($\times 10^6$ células/mL), conforme a ordem da ordenha pós-parto - São Paulo - 2008

Ordenha	Mononucleares ($\times 10^6$)	Polimorfonucleares ($\times 10^6$)	Leucócitos Totais ($\times 10^6$)
Primeira	$0,657^A$	$0,178^B$	$0,878^B$
Segunda	$0,828^A$	$0,392^A$	$1,260^A$
Significância	$P > 0,09$	$P < 0,0001$	$P < 0,002$

A, B - Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre eles.

Gráfico 02 - Mediana dos valores absolutos dos leucócitos (células/mL) do colostro bovino, conforme a ordem da ordenha pós-parto - São Paulo - 2008

a) Predomínio de células mononucleares

a) Polimorfonuclear (seta)

Figura 06 - Fotomicrografias das células do colostro bovino, empregando-se a técnica de Prescott e Breed (1910), coloração de Rosenfeld (1949) e microscopia óptica de imersão (1000x) - São Paulo - 2008

4.2 Análise citológica qualitativa: contagem diferencial dos leucócitos do colostro bovino

A seguir serão descritos os valores relativos e absolutos de cada tipo leucocitário encontrado no colostro bovino pela técnica de citocentrifugação.

4.2.1 Valores Relativos

Os valores relativos médios dos monócitos/células epiteliais, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos obtidos nas amostras de colostro foram de 69,5; 16,4; 13,3 e 0,27%, respectivamente antes da primeira ordenha pós-parto das vacas estudadas (Tabela 02 e Gráfico 03).

As amostras de colostro obtidas antes da segunda ordenha pós-parto apresentaram valores médios de 68,0; 13,4; 18,5 e 0%, respectivamente, de monócitos e células epiteliais, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (Tabela 02 e Gráfico 04).

Quanto aos valores relativos dos diferentes tipos leucocitários do colostro das vacas estudadas, não foram observadas diferenças significativas entre os tipos leucocitários considerando-se a ordem de ordenha pós-parto ($P > 0,17$) (Tabela 02).

Tabela 02 - Média dos valores relativos dos leucócitos do colostro bovino, conforme a ordem da ordenha pós-parto - São Paulo - 2008

Ordenha	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos/Células Epiteliais	Eosinófilos
Primeira	$13,3 \pm 19,4^A$	$16,4 \pm 9,8^A$	$69,5 \pm 17,4^A$	$0,27^A$
Segunda	$18,5 \pm 21,4^A$	$13,4 \pm 11,8^A$	$68,0 \pm 21,0^A$	0^A
Significância	$P > 0,2$	$P > 0,17$	$P > 0,7$	$P > 0,3$

A - Valores médios com letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferenças estatísticas entre si.

Gráfico 03 – Valores médios relativos obtidos no exame diferencial dos leucócitos do colostro bovino antes da primeira ordenha pós-parto - São Paulo - 2008

Gráfico 04 – Valores médios relativos obtidos no exame diferencial dos leucócitos do colostro bovino antes da segunda ordenha pós-parto - São Paulo - 2008

4.2.2 Valores Absolutos

Os valores medianos absolutos dos tipos leucocitários diferenciados no colostro bovino foram: $0,640 \times 10^6$ monócitos/células epiteliais, $0,136 \times 10^6$ linfócitos e $0,045 \times 10^6$ neutrófilos/mL de colostro, obtidos antes da primeira ordenha pós-parto das vacas (Tabela 03, Gráfico 05 e Figura 08).

A análise das amostras obtidas antes da segunda ordenha revelaram os valores medianos absolutos de $0,772 \times 10^6$ monócitos/células epiteliais, $0,098 \times 10^6$ linfócitos e $0,203 \times 10^6$ neutrófilos/mL de colostro (Tabela 03, Gráfico 05 e Figura 07).

O confronto dos valores medianos absolutos de cada tipo de leucócito encontrado no colostro bovino, conforme o momento da colheita das amostras, revelou diferença para os neutrófilos, sendo maiores os seus valores antes da segunda ordenha pós-parto em relação à primeira ($P < 0,0001$).

Não foi possível observar diferenças significativas entre valores dos outros tipos leucocitários identificados ($P > 0,2$).

Tabela 03 - Valores medianos absolutos dos tipos leucocitários (Ne - neutrófilos; Li - linfócitos; MO+EP – macrófagos/células epiteliais) observados no colostro bovino, conforme o momento da colheita - São Paulo - 2008

Ordenha	Ne x 10 ⁶	Li x 10 ⁶	MO+EP x 10 ⁶
Primeira	0,045 ^B	0,136 ^A	0,640 ^A
Segunda	0,203 ^A	0,098 ^A	0,772 ^A
Significância	P<0,0001	P>0,7	P>0,2

A, B – Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre si.

Gráfico 05 – Histograma representando os valores medianos absolutos dos tipos leucocitários observados no colostro bovino por meio da técnica de citocentrifugação - São Paulo - 2008

Figura 07 - Fotomicrografias das células do colostro bovino, identificadas morfológicamente empregando microscopia óptica de imersão (1000x) - São Paulo - 2008

4.3 Concentração de Imunoglobulinas do Colostro Bovino

Os valores médios absolutos da concentração de **Imunoglobulinas da classe G** obtidos no colostro colhido antes da primeira e da segunda ordenha foram de 10.078,0 e 6.591,0 mg/dL de colostro, respectivamente (Tabela 04 e Gráfico 06).

Os valores médios absolutos da concentração de **Imunoglobulinas da classe A** obtidos no colostro colhido antes da primeira e da segunda ordenha foram de 413,8 e 298,0 mg/dL de colostro, respectivamente (Tabela 04 e Gráfico 07).

Os valores médios absolutos da concentração de **Imunoglobulinas da classe M** obtidos no colostro colhido antes da primeira e da segunda ordenha foram de 625,0 e 348,8 mg/dL de colostro, respectivamente (Tabela 04 e Gráfico 08).

Comparando-se as dosagens de imunoglobulinas no colostro colhido antes da primeira e segunda ordenha, observou-se que houve diferença entre as taxas de IgG ocorrendo uma maior dosagem na primeira ordenha, sendo o mesmo observado para a IgM ($P < 0,0001$) enquanto para a IgA não ocorreu diferença entre as taxas conforme a ordem das ordenhas realizadas ($P > 0,14$).

Comparando-se as dosagens das classes de imunoglobulinas mensuradas no colostro obtido antes da primeira e da segunda ordenha, caracterizando-se que a IgG apresentaram maiores valores que as IgA e IgM ($P < 0,0001$).

Tabela 04 – Concentração das classes de imunoglobulinas nas amostras de colostro bovino, obtidas antes da primeira e segunda ordenha - São Paulo - 2008

Ordenha	IgG (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgM (mg/dL)	Significância
Primeira	10.078,0 ± 3462 ^{Aa}	413,8 ± 302,0 ^{Ab}	625,0 ± 220,0 ^{Ab}	P<0,0001
Segunda	6.591,0 ± 3364 ^{Ba}	298,0 ± 343,1 ^{Ab}	348,8 ± 224,9 ^{Bb}	P<0,0001
Significância	P<0,0001	P>0,14	P<0,0001	

A, B – Valores com letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa das taxas de Igs segundo a ordem das ordenhas.

a, b – Valores com letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa entre as classes de Igs em cada ordenha.

Gráfico 06 – Concentração de imunoglobulinas da classe G (mg/dL) nas amostras de colostro bovino obtidas antes da primeira e da segunda ordenha - São Paulo - 2008

Gráfico 07 – Concentração de imunoglobulinas da classe A, nas amostras de colostro bovino obtidas antes da primeira e da segunda ordenha – São Paulo - 2008

Gráfico 08 – Concentração de imunoglobulinas da classe M (mg/dL) nas amostras de colostro bovino obtidas antes da primeira e da segunda ordenha São Paulo - 2008

4.4 Atividade Bactericida dos Fagócitos do Colostro Bovino

Os valores medianos de peróxido de hidrogênio em nmoles/milhões de fagócitos foi de 134,0; 123,1; 133,5 nas amostras obtidas antes da primeira ordenha das vacas. Na amostra de colostro colhido antes da segunda ordenha foram obtidos os seguintes valores medianos: 49,9; 54,5; e 59,3 nmoles/milhões de fagócitos (Tabela 05 e Gráficos 09 a 11).

Não houve diferença quando comparados os resultados dos ensaios C, NO e O dentro de cada ordenha ($P>0,5$), porém ocorreram diferenças quando comparados aos valores de cada grupos segundo as ordenhas, sendo que todos os ensaios apresentaram o mesmo comportamento, onde na primeira ordenha os valores de liberação de peróxido de hidrogênio foram maiores que aqueles obtidos na segunda ordenha ($P<0,04$) (Tabela 05 e Gráficos 09 a 11).

Tabela 05 – Valores medianos da concentração de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) produzido pelos fagócitos do colostro bovino, na ausência ou em presença de ECET opsonizada ou não opsonizada (C=controle; NO=ECET não opsonizada; e O=ECET opsonizada) - São Paulo - 2008

Ordenha	C	NO	O	Significância
Primeira	134,0 ^{Aa}	123,1 ^{Aa}	133,5 ^{Aa}	$P>0,2$
Segunda	49,9 ^{Ba}	54,5 ^{Ba}	59,3 ^{Ba}	$P>0,6$
Significância	$P<0,0002$	$P<0,0003$	$P<0,0003$	

A, B – Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre si.

a, b – Valores com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre si.

Gráfico 09 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) pelos fagócitos obtidos do colostro bovino de primeira e segunda ordenha pós-parto no grupo controle - São Paulo - 2008

Gráfico 10 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) pelos fagócitos obtidos do colostro bovino de primeira e segunda ordenha pós-parto, no grupo contendo células e ECET não opsonizada - São Paulo - 2008

Gráfico 11 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmoles/milhões de células) pelos fagócitos obtidos no colostro de primeira e segunda ordenha pós-parto, no grupo contendo células e ECET opsonizada com soro do colostro bovino - São Paulo - 2008

4.5 Correlação entre a atividade bactericida indireta dos fagócitos e os outros componentes imunológicos do colostro

A correlação entre a atividade bactericida indireta dos fagócitos e a quantidade de imunoglobulinas da classe M foi positiva ($r=0,241$; $P<0,05$), no ensaio controle (C) e no ensaio NO ($r=0,285$; $P<0,02$) (Gráficos 12 e 13).

Gráfico 12 – Correlação entre a quantidade de imunoglobulinas da classe M e peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos do colostro bovino no ensaio C (controle) – São Paulo - 2008

Gráfico 13 – Correlação entre a quantidade de imunoglobulinas da classe M e peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos do colostro bovino no ensaio NO (fagócitos e ECET não opsonizada) – São Paulo - 2008

5 DISCUSSÃO

O colostro e o leite são compostos de vários fatores nutricionais e elementos imunoprotetores solúveis e celulares, capazes de conferir imunidade contra uma variedade de microorganismos patogênicos (CROSS; GILL, 2000; KORHONEN; MARNILA; GILL, 2000), responsáveis pelos altos índices de morbidade e mortalidade de animais recém-nascidos, reduzindo a produtividade dos rebanhos leiteiros do Brasil e do mundo (RADOSTITS et al., 2007).

A imaturidade do sistema imune dos bezerros neonatos torna indispensável à transferência de imunidade passiva através do colostro (TIZARD, 2002; SMITH, 2006; RADOSTITS et al., 2007), porém os mecanismos pelos quais os fatores imunológicos do colostro protegem os bezerros neonatos ainda são parcialmente compreendidos.

Até o momento, a literatura evidencia que as pesquisas direcionam-se principalmente ao estudo da transferência de imunidade através das imunoglobulinas colostrais, sendo poucos os trabalhos avaliaram a importância e o envolvimento das células do colostro na imunidade passiva dos animais neonatos (LaMOTTE; EBERHART, 1976; LOMBARDO, 1979; BESSER, 1993; MILLER, 1983; STOOT; FELLAH, 1983; RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1990; RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1991; RIEDEL-CASPARI et al., 1991; RIEDEL-CASPARI, 1993; STEINHARDT et al., 1993; BESSER, 1993; BESSER; OSBORNE, 1993; ALDRIDGE; MCGUIRE; LUNN, 1998; MENGE et al., 1998; TYLER et al., 1989; ROTHKÖTTER; PABST; BAILEY, 1999; PABST; ROTHKÖTTER, 1999; PFISTER et al., 2000; FEITOSA et al., 2001; HAGIWARA et al., 2001; ROKKA et al., 2001; GUTZWILLER, 2002; PARRENO et al., 2004; BROOKS et al., 2006).

Neste trabalho foi possível estudar a função dos fagócitos do colostro bovino, verificando a quantidade e o predomínio dos tipos celulares, assim como a atividade bactericida para a ETEC e mecanismos de opsonização.

Além disso, verificou-se a quantidade de cada uma das classes de imunoglobulinas presentes no colostro de vacas da raça Holandesa.

A diferenciação das amostras de colostro quanto ao momento da colheita foi importante para a identificação de oscilações em alguns dos seus componentes imunológicos, assim como identificar e discutir suas possíveis causas, e a influência sobre a qualidade imunológica deste alimento em diferentes momentos do período pós-parto.

A importância deste trabalho reside particularmente em suprir a escassez de pesquisas brasileiras sobre o assunto, uma vez que em geral foram focadas na avaliação das imunoglobulinas. Mundialmente, o reconhecimento da importância das células do colostro aconteceu depois que alguns autores comprovaram a suspeita de que além das macromoléculas, os leucócitos colostrais poderiam passar através do trato gástro-intestinal do neonato para a sua circulação sanguínea, sendo pois um componente adicional do colostro para atuar na defesa orgânica e minimizar a debilidade do sistema imune de bezerros recém-nascidos.

5.1 Citologia do Colostro Bovino

Na presente pesquisa foi possível observar que o colostro bovino contém leucócitos e células descamativas, chamadas de “body cells” por Prescott e Breed (1910) e células somáticas por Paape et al. (1963).

Poucas são as pesquisas destinadas à avaliação da celularidade do colostro bovino (RIEDEL-CASPARI, 1993; BARRINGTON; PARISH, 2001). No presente estudo foi possível obter fagócitos viáveis antes da primeira e segunda ordenha pós-parto das vacas holandesas estudadas, fato concordante com os trabalhos da literatura que citam que o colostro e leite diferem da maioria das secreções orgânicas, por apresentarem leucócitos viáveis (HONÓRIO, 1998).

A citologia do colostro bovino merece destaque, pois os leucócitos que contém, podem vencer e ultrapassar a barreira intestinal, sendo encontrados no sangue 6 (seis) horas da ingestão deste alimento (TIZARD, 2002), assim, o

colostro poderia fornecer leucócitos para a circulação sistêmica dos neonatos, ampliando sua resposta imunológica, através das células de memória, além daquelas ações reconhecidas e exercidas pelos macrófagos, e por meio da produção de imunoglobulinas e citocinas (BARRINGTON; PARISH, 2001).

5.1.1 Análise citológica quantitativa: contagem total de leucócitos do Colostro Bovino

A quantidade mediana de leucócitos totais obtida nas amostras de colostro das vacas holandesas colhidas antes da primeira ordenha e utilizadas na pesquisa foi de 878.466 células/mL. Considerando que quase a totalidade é representada por fagócitos, e este valor de células for multiplicado pela quantidade de colostro (quatro litros) ministrado aos bezerros neonatos nas primeiras doze horas de vida, significa que esse recém-nascido poderia ingerir aproximadamente um total de 35 milhões de fagócitos/4L de colostro fresco, que podem atuar na imunidade da mucosa intestinal contra microorganismos causadores de diarreia neonatal, como a ECET (ROTHKÖTTER; PABST; BAILEY, 1999; SALMON, 1999), ou podem ainda vencer a barreira intestinal, ganhando a circulação sanguínea e assim atuarem sistemicamente (TIZARD, 2002). Constatação inédita também é a de que o número total de leucócitos aumenta de forma significativa no momento imediatamente antes da segunda ordenha. Adicionalmente o maior número de leucócitos em colostro de obtido antes da segunda ordenha fala a favor da possibilidade da sua utilização, considerando a riqueza celular, mesmo que não seja da primeira ordenha.

O valor mediano de células somáticas do colostro de vacas Holandesas encontrado na presente pesquisa foi superior ao valor observado por McDonald e Anderson (1981), Jensen e Eberhart (1981) e Estrella (2001), e inferior aos verificados por Raimundo (2006), provavelmente sendo as divergências são decorrentes dos diferentes manejos sanitários praticados nos rebanhos estudados, ou pelo momento da colheita das amostras pós-parto.

Os números de fagócitos identificados no colostro bovino apontam para os benefícios da administração do colostro fresco em relação ao colostro

congelado, que não possui células de defesa viáveis.

A população celular observada com a avaliação pela técnica microscópica direta foi composta predominantemente por leucócitos mononucleares, fato também verificado com o uso do método da citocentrifugação, considerado padrão para a diferenciação dos tipos de leucócitos presentes no leite.

5.1.2 Análise citológica qualitativa: valores relativos dos diferentes tipos leucocitários do colostro bovino

Utilizando-se a contagem diferencial dos leucócitos do colostro em lâminas obtidas por citocentrifugação foi possível estabelecer a proporção dos diferentes tipos de leucócitos, que pode estar alterada de acordo com estímulos fisiológicos, como a fase da lactação. No entanto, foram encontrados poucos trabalhos que estudaram a citologia do colostro bovino.

O exame diferencial dos leucócitos do leite é importante para determinar a presença de condição inflamatória na glândula mamária e estabelecer a fase de lactação (LEE et al., 1980; JENSEN; EBERHART, 1981; ÖSTENSSON, 1993). A utilização deste exame para diagnóstico de mamite em vacas na fase colostrar é importante, pois a contagem total de células somáticas pode estar normal quando o material biológico analisado for o colostro, pois neste período de lactação, o mesmo apresenta fisiologicamente celularidade aumentada, mesmo em ausência de inflamação mamária (RAIMONDO, 2006).

Todos os tipos de leucócitos foram observados no colostro bovino, com exceção dos basófilos. Encontraram-se predomínio de macrófagos e células epiteliais, seguido por proporções decrescentes de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, concordando com as citações de Schalm et al. (1971) e Salmon (1999). Os eosinófilos foram encontrados na secreção colostrar dos quartos mamários de apenas uma das 53 vacas utilizadas nesta pesquisa. O predomínio de macrófagos no colostro bovino também foi observado por Smith & Goldman (1968) e Jensen e Eberhart (1981).

No presente estudo, optou-se por não classificar separadamente as

células epiteliais e os macrófagos, pois muitas vezes foi impossível diferenciá-las por sua semelhança morfológica, além disso, a literatura ainda é controversa sobre o assunto, pois alguns autores consideram que os macrófagos podem sofrer variações morfológicas de acordo com seus diferentes graus de ativação e podem ser classificados como células epiteliais (SCHALM et al., 1971; LEE, 1980; OSTENSSON, 1980; JENSEN; EBERHART, 1981; SANDGREN, 1991). Inclusive foi detectado que células anteriormente consideradas como epiteliais e com capacidade de fagocitar (SCHALM et al., 1971), eram na realidade células da série monócito/macrófago (LEE, 1980; OSTENSSON, 1980; JENSEN; EBERHART, 1981).

Dulin, Paape e Weinland (1982) avaliaram a citologia do leite bovino usando o método de citocentrifugação e obtiveram predomínio de neutrófilos, seguidos em números decrescentes pelos macrófagos, linfócitos e eosinófilos, divergindo dos resultados encontrados no presente estudo do colostro bovino, em função da influência do período de lactação e da sanidade da glândula mamária dos animais utilizados, uma vez que não há menção de ser considerados estes fatos pelos retro-referidos autores.

Miller, Paape e Fulton (1991) encontraram valores relativos para os neutrófilos e menor para os macrófagos e células epiteliais, e proporção semelhante de linfócitos no colostro de vacas na segunda semana pós parto, divergindo estes resultados parcialmente aos encontrados na presente pesquisa, provavelmente pelos diferentes momentos de ordenha analisados.

Os tipos leucocitários do colostro bovino também foram qualitativamente divergentes daqueles encontrados no leite de búfalas avaliado por Della Libera (2002), que observou predomínio de células mononucleares, porém com maior proporção de neutrófilos e eosinófilos, e menores magnitudes percentuais de monócitos e linfócitos, quando comparadas com as proporções obtidas nesta investigação.

Madureira (2006) estudou a citologia do leite de cabras por meio da técnica de citocentrifugação registrando percentagens de 73,24% para os neutrófilos; de 3,55 % de linfócitos; de 24,33% para monócitos e células epiteliais, sendo estes valores divergentes dos encontrados no colostro bovino, o qual apresentou predomínio de células mononucleares, fato justificado pelas diferenças entre as secreções lácteas destas espécies analisadas, pois cabras

possuem glândula com secreção láctea do tipo apócrina e vacas possuem aquelas do tipo merócrina. Adicionalmente, a retro-mencionada autora estudou o leite, obtido em fase de lactação diferente da avaliada na presente investigação.

Em humanos, 40% das células do colostro são linfócitos, porém nesta investigação verificou-se que os linfócitos correspondem somente a 16,4% do total de células do colostro bovino. O número total de células do colostro e o valor relativo de linfócitos citados por Tizard (2002) são inferiores aos observados na presente investigação. Deve-se ainda ressaltar que uma das limitações encontradas com o uso da técnica de citocentrifugação foi a diferenciação morfológica entre núcleos destacados do citoplasma de algumas células, principalmente de células epiteliais, e os linfócitos, fato este também destacado por Schalm et al. (1971). Na presente investigação foram tomados cuidados para diferenciá-los (núcleos e linfócitos), sendo considerado o tamanho e disposição da cromatina nuclear, pois os linfócitos possuem cromatina mais condensada que os outros leucócitos. Este critério de diferenciação pode não ter sido utilizado nas outras pesquisas realizadas, fato que pode ter aumentando aparentemente o número de linfócitos do colostro. Barrington e Parish (2001) também encontraram maiores valores linfocitários do que os observados nesta investigação.

Através da análise microscópica dos esfregaços lácteos obtidos por citocentrifugação também foram encontrados debris celulares e corpúsculos de colostro, denominados por Schalm et al. (1971) como corpúsculos de Niessen.

Amostras colhidas antes da segunda ordenha das vacas apresentaram um maior número de fagócitos/mL de colostro, em decorrência de um certo aumento de fagócitos polimorfonucleares, quando comparados com os tipos de leucócitos obtidos antes da primeira ordenha das vacas. Este fenômeno aparentemente fisiológico aponta para objetivos diferenciados considerando os dois momentos analisados, pois os fatores imunológicos do colostro antes da primeira ordenha visam particularmente a imunidade neonatal (TAYLOR et al., 1997), e em seguida, a imunidade da glândula mamária materna (PAAPE et al., 2003). Acredita-se que o quadro diferencial dos leucócitos do colostro reflète a necessidade específica da função celular exercida pelos leucócitos predominantes (ÖSTENSSON, 1993).

Honório (1995) estudou a atividade microbicida dos fagócitos do colostro humano e destacou ser difícil compreender como os macrófagos do colostro estariam atuando no organismo do neonato, mas ao mesmo tempo questionou sobre o papel biológico de tão grande número destas células, que é ainda maior no colostro bovino. O macrófago é uma célula que possui atividade fagocítica, podendo liberar citocinas e apresentar antígenos, porém ainda indaga-se o que seria mais importante ao neonato que ingere colostro.

5.2 Concentração de Imunoglobulinas do Colostro Bovino

A placenta bovina, do tipo sindesmocorial, impede a passagem de anticorpos maternos para o feto durante o período de gestação, fato que associado à imaturidade do sistema imune de bezerros neonatos, torna muito importante à administração de colostro nas primeiras horas após seu nascimento, para prevenir as doenças ocorridas no período neonatal, inclusive as colidiarréias (TIZARD, 2002).

O colostro é formado através da mamogênese e colostrogênese no período pré-parto (BARRINGTON; PARRISH, 2001), e grandes quantidades de imunoglobulinas, principalmente IgG1, são transferidas da circulação materna e de áreas adjacentes à mama, para a glândula mamária, através de mecanismos parcialmente conhecidos (LASCELLES, 1979; LARSON, 1980; BARRINGTON et al., 2001).

Apesar da reconhecida importância das imunoglobulinas do colostro bovino para os recém-nascidos, e várias pesquisas sobre o assunto já terem sido realizadas, ainda pouco se conhece a respeito dos valores de referência das classes de imunoglobulinas encontradas no colostro de vacas da raça Holandesa criadas no Brasil, padrões influenciados principalmente pelos seguintes aspectos: idade, ordem da ordenha, fator racial, manejos sanitário e nutricional, e adaptação às condições climáticas brasileiras.

O conhecimento dos teores de imunoglobulinas do colostro de vacas holandesas é importante para o estabelecimento do volume de colostro a ser fornecido ao neonato. Assim, as imunoglobulinas colostrais poderiam atuar na

proteção da mucosa intestinal, impedindo a instalação da ECET e outros patógenos, ou através de proteção sistêmica (ROTHKÖTTER; PABST; BAILEY, 1999; SALMON, 1999).

Nesta pesquisa foram observados valores médios de 10.078,0; 413,8; e 625,0 mg/dL de IgG, IgA e IgM no colostro colhido de vacas da raça Holandesa antes da primeira ordenha, respectivamente. Se estes valores forem multiplicados pela quantidade de colostro (quatro litros) ministrado aos bezerros neonatos nas primeiras doze horas de vida, conforme protocolo recomendado por Gay e Besser (1991) e Morin et al. (1997) para vacas leiteiras, significa que esse recém-nascido poderia ingerir o total de 403 gramas de IgG, 16,5g de IgA e 25g de IgM, valores bem superiores ao valor de 100g de imunoglobulinas recomendado por Radostits et al (2007) para conferir proteção aos bezerros no período neonatal.

No presente trabalho constatou-se uma maior concentração de imunoglobulinas da classe G, seguidas por valores decrescentes das classes M e A, nas amostras de colostro obtidas antes da primeira e da segunda ordenha, concordando com os dados de Devery-Pocius e Larson (1983) e Tizard (2002).

Muller e Ellinger (1981) avaliaram a concentração de IgG, IgA e IgM em colostro de vacas da raça Holandesa criadas na Filadélfia, EUA, e encontraram valores relativos de 73,7% de IgG, 18,0% de IgA e 8,3% de IgM, caracterizando-se valores de IgG menores que os observados na presente investigação, talvez pela idade das vacas estudadas, ordem da ordenha pós-parto, manejo sanitário dos rebanhos, relacionado principalmente ao histórico vacinal das vacas no período pré-parto, pois as fêmeas utilizadas nesta pesquisa foram imunizadas nesse período através de vacinação com Rotatec-J5[®] (diarréia neonatal e mastite ambiental), Kevac[®] (ceratoconjuntivite infecciosa bovina) e Sintoxan[®] (clostridioses). Oyeniyi e Hunter (1978) também encontraram maiores taxas de IgG, quando comparadas às obtidas neste trabalho.

Oyeniyi e Hunter (1978) avaliaram a concentração de imunoglobulinas da classe G no colostro de vacas Holandesas de primeira lactação, obtidos nas três primeiras ordenhas pós-parto, e verificaram valores médios de 3240 mg/dL e 2.540 mg/dL de IgG em amostras de colostro obtidas respectivamente, na primeira e segunda ordenha. Esses pesquisadores observaram diminuição na

concentração de IgG na segunda ordenha, quando comparada àquelas de primeira ordenha, oscilação também verificada no presente estudo.

Soares Filho et al. (2001) estudaram a concentração de IgG no colostro de vacas Holandesas no Estado de Minas Gerais e obtiveram valores semelhantes aos observados na presente pesquisa.

Vaz et al. (2004) avaliaram amostras de colostro de vacas holandesas criadas no Estado de Minas Gerais e encontraram valores de imunoglobulinas totais inferiores aos observados nesta investigação, porém tal autor não especificou a raça e estado sanitário das vacas produtoras do colostro, além disso, utilizou técnica indireta qualitativa (turbidez com sulfato de zinco), para estimar a concentração de anticorpos das amostras de colostro, diferente do método de imunodifusão radial utilizado neste estudo.

5.3 Atividade Bactericida dos Fagócitos do Colostro Bovino para a ECET

A importância das células viáveis do colostro para prevenção de enfermidades como a enterocolite necrosante em ratos provocada pela *Klebsiella pneumoniae*, ou infecções por *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* foi evidenciada em alguns trabalhos (PITT et al., 1977; RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1991b,c,d,e; RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1993), mostrando maior atividade bactericida do colostro fresco quando comparado ao colostro congelado. Além disso, foi comprovada a passagem pelo intestino de linfócitos do colostro para a circulação sanguínea dos bezerros neonatos, e que podem assumir ação imunológica local e sistêmica (TIZARD, 2002).

Em função da alta mortalidade de bezerros neonatos causada pela colidiarréia nos primeiros dias de vida, através dos mecanismos patogênicos da ECET (MOON, 1978; NAGY; FEKETE, 1999), associado ao pequeno número de pesquisas a respeito de aspectos funcionais dos leucócitos do colostro bovino, foi proposto neste trabalho, avaliar a atividade bactericida dos fagócitos do colostro contra a ECET.

A atividade microbicida dos fagócitos do colostro mensurada por meio da análise da quantidade de peróxido de hidrogênio liberada foi evidenciada no colostro obtido antes da primeira e da segunda ordenha.

Não foram observadas diferenças entre a liberação de peróxido de hidrogênio pelos leucócitos do colostro de primeira e segunda ordenha no ensaio controle (constituído só por fagócitos), no ensaio NO (constituído por fagócitos e ECET não opsonizada) e no ensaio O (contendo fagócitos e ECET opsonizada).

O peróxido de hidrogênio é liberado pelos macrófagos e neutrófilos após a fagocitose. Os macrófagos, células predominantes no colostro bovino, têm capacidade de localizar partículas, opsonizadas ou não, para fagocitá-las e destruí-las intracelularmente. A fagocitose inespecífica dos macrófagos do colostro bovino pode ter colaborado com a ausência de diferenças significativas entre os ensaios utilizados nesta pesquisa, pois o colostro possui uma grande concentração de glóbulos de gordura e outras substâncias, que poderiam ser fagocitadas e estimulariam a liberação de peróxido de hidrogênio, mesmo na

ausência da ECET.

A quantidade de peróxido de hidrogênio teve maior magnitude no ensaio contendo ECET opsonizada, sendo seguida por aquela com ECET não opsonizada e menor no grupo controle (ausência da ECET), respectivamente, usando-se fagócitos oriundos de amostras de colostro colhidas antes da segunda ordenha. Ou seja, a ECET foi capaz de estimular a atividade bactericida indireta dos fagócitos do colostro obtidos antes da segunda ordenha, apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas entre os ensaios realizados.

O colostro colhido antes da segunda ordenha apresentou maior número de fagócitos polimorfonucleares na análise citológica qualitativa realizada usando a técnica de citocentrifugação, quando comparado com aquele do colostro proveniente de colheita realizada antes da primeira ordenha, o que poderia indicar a razão da diferenciação entre os ensaios avaliados.

A fagocitose de macrófagos e neutrófilos foi considerada semelhante por alguns pesquisadores, porém os macrófagos apresentam menor capacidade de metabolismo oxidativo, e talvez, se a população de neutrófilos do colostro colhido antes da primeira ordenha fosse maior, poderiam ser observadas diferenças entre os ensaios analisados, pela maior liberação de peróxido de hidrogênio determinada por estas células, que ressaltaria o fenômeno da atividade bactericida dos fagócitos para a ECET. Em função deste fato, pode-se suspeitar que o mecanismo bactericida dependente de oxigênio seja mais importante para a defesa da glândula mamária das mães e não para a defesa dos neonatos, pois os neutrófilos estão em pequena proporção no colostro bovino de primeira ordenha e tendem a aumentar nas ordenhas subsequentes.

A falta de diferenciação estatística entre os ensaios sem e com estimulação antigênica também foi verificado por Della Libera (2002) quando avaliou a atividade dos fagócitos do leite de búfalas, verificando valores semelhantes de peróxido de hidrogênio entre o grupo de fagócitos sem e com estímulo antigênico promovido com o uso do Phorbol 12-miristrato 13-acetato (PMA). A ausência de diferença na liberação de peróxido de hidrogênio com e sem estímulo com PMA pode significar que a liberação espontânea dos fagócitos do leite de búfalas híginas já estaria sendo mantida no limite máximo e estes fagócitos seriam indiferentes ao estímulo do PMA. O mesmo fenômeno

pode ter ocorrido na presente pesquisa.

Sandgren et al. (1991) consideraram que os leucócitos da secreção mamária de fêmeas bovinas no início da lactação apresentavam menor atividade microbicida, resultante de mecanismos dependentes de oxigênio, fato que poderia predispor a mãe às infecções da glândula mamária, o que também justificaria a não diferenciação entre a liberação de peróxido de hidrogênio nos ensaios estudados.

Utilizando as técnicas para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio descritas por Pontes (1999), a quantidade mensurada do peróxido superou os valores contidos nos intervalos da curva padrão, e impediram a conversão dos valores, tornando necessária a diluição seriada das amostras nas placas de microcultivo A/2.

Os valores medianos de peróxido de hidrogênio verificados no presente estudo foram superiores aos encontrados por Della Libera (2002) no leite de bubalinos e por Pontes (1999) no colostro de humanos. Sendo válido ainda ressaltar que o colostro humano possui diferenças significativas em relação ao colostro bovino, com predomínio de imunoglobulinas da classe A e maior proporção de neutrófilos (60%). Nesse contexto, merece também destaque, que em muitas amostras de colostro havia uma alta concentração de fagócitos, sendo nesta situação possível observar grumos de células durante a contagem das células viáveis em hemocítmetro. Apesar da padronização da concentração de fagócitos para um número de 2×10^6 células, a ser utilizado nos ensaios de avaliação da atividade bactericida indireta, pode ser que em algumas amostras o número de leucócitos foi superior ao padronizado, ocorrendo uma maior liberação de peróxido de hidrogênio.

Outro fato digno de nota é que a concentração de peróxido de hidrogênio obtida na primeira ordenha de todos os ensaios analisados (controle, NO, O) foi praticamente o dobro dos valores obtidos na segunda ordenha das vacas doadoras de colostro, porém o contrário deveria ter ocorrido, pois o maior número de neutrófilos estava presente na segunda ordenha e deveria provocar um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio, uma vez que estas células possuem maior capacidade de metabolismo oxidativo. No entanto, o grau de ativação das células obtidas antes da primeira e da segunda ordenha podem ser distintos, promovendo uma

maior liberação de peróxido de hidrogênio. Nos exames microscópicos dos esfregaços de colostro obtidos por citocentrifugação, foi possível observar que as características morfológicas dos macrófagos do colostro são de células ativas, maiores, vacuolizados, quando comparados aos monócitos.

A grande quantidade de lipídeos presentes no colostro pode ser limitante na atividade dos fagócitos, pois estudos “in vitro” demonstraram que estas células na presença de lipídeos, são capazes de ingerir grandes quantidades de glóbulos de gordura. Esse acúmulo de lipídeos no interior dos fagócitos é suficiente para interferir na atividade funcional (PICKERING et al., 1983), conforme observado nas amostras obtidas antes da primeira ordenha, que possuíam uma maior quantidade de lipídeos, em comparação com aquela apresentada pelo colostro obtidos antes de segunda ordenha.

5.4 Relação entre a Atividade Bactericida Indireta dos Fagócitos e os outros Componentes Imunológicos do Colostro

A otimização da fagocitose ocorre após a opsonização das bactérias pelo componente C3b do sistema complemento, ou por meio da ligação da porção FAB do anticorpo com a bactéria, e a sua porção FC com o fagócito. Após a fagocitose, ocorre a liberação de peróxido de hidrogênio (SEGAL; SOOTHILL, 1983; HONÓRIO, 1995; CHAMPE; HARVEY, 1996; TIZARD, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2007). Em função da atividade das imunoglobulinas na opsonização de bactérias e atividade bactericida dos fagócitos, neste trabalho estudou-se a correlação entre estes dois mecanismos imunológicos.

A maior quantidade de peróxido de hidrogênio liberada pelos fagócitos do colostro obtido antes da primeira ordenha, pode estar relacionada com a quantidade de imunoglobulinas do colostro, opsonização e ativação dos fagócitos, pois neste trabalho encontraram-se maiores teores de anticorpos no colostro de primeira ordenha.

A maior quantidade de neutrófilos no colostro colhido antes da segunda ordenha pode ter sido responsável pela menor liberação de peróxido de hidrogênio pelos fagócitos do colostro bovino neste momento, quando

comparado aos valores obtidos na primeira ordenha, uma vez que esta comprovado na literatura que os neutrófilos possuem maior atividade fagocítica no sangue, quando comparado ao leite, por que os glóbulos de gordura e caseína do leite promovem a formação de fagolisossomos, recobertos por porções da membrana celular dos fagócitos, reduzindo a formação de pseudópodes e movimentos de rolamento celular, diminuindo desta forma a atividade fagocítica e bactericida destes fagócitos (PAAPE et al., 2003).

Na presente pesquisa foi observada uma correlação positiva entre as quantidades de imunoglobulinas M (IgM) e a quantidade de peróxido de hidrogênio, nos ensaios C e NO nas amostras de colostro obtidas antes da primeira e da segunda ordenha das vacas doadoras de colostro, fato não observado no ensaio O. Sabe-se que a IgM é mais eficiente que a IgG no processo de opsonização de bactérias (WILLIAMS; HILL, 1982; MILLER et al., 1988; BARRIO et al., 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2007), porém no ensaio realizado com fagócitos e ECET opsonizada (O) não observou-se correlação positiva entre IgM e a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada. Apesar da não identificação de receptores para IgM nas membranas plasmática dos fagócitos, a correlação positiva observada nesta pesquisa sugere a presença destes receptores, conforme citado por Grewal et al. (1978).

Outro fato a ser considerado é a que a despeito dos macrófagos serem as células predominantes no colostro bovino, e possuírem receptores para a IgG e IgA em suas membranas (GREWAL et al., 1978; GUIDRY et al., 1980; MILLER et al., 1988; BIANCHI et al., 1996), não foi possível observar correlação positiva entre a atividade bactericida indireta dos fagócitos e as taxas de imunoglobulinas das classes G e A no colostro bovino.

A avaliação da opsonização não foi realizada pelo alto custo dos materiais necessários a essa finalidade, e não propostos inicialmente neste trabalho. Portanto, apenas foi utilizado um protocolo padrão para a promoção deste processo, e a ECET pode não ter sido adequadamente opsonizada, o que seria a razão de não provocar diferenças entre a liberação de peróxido de hidrogênio nos ensaios C, NO e O. Porém, os resultados obtidos são confusos, pois nas amostras de colostro colhidas antes da segunda ordenha, houve uma maior liberação de peróxido de hidrogênio no ensaio O, quando comparado aos C e NO, mesmo com menores teores de imunoglobulinas, que aquelas

determinadas no colostro bovino colhido antes da primeira ordenha.

No colostro obtido antes da segunda ordenha há uma maior quantidade de neutrófilos, que possuem mais receptores para IgG2 (WATSON, 1976; LASCELLES, 1979), e através da consideração da ação destes dois fatores, a atividade bactericida dos fagócitos foi superior nos ensaios contendo ECET, pois a IgG é a imunoglobulina predominante no colostro bovino. Nesta pesquisa não foram avaliadas separadamente as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2), no entanto é conhecido o predomínio da IgG1 que pode ter sido responsável pela ausência de correlações positivas entre IgG e atividade bactericida dos fagócitos nos ensaios estudados. Miller et al. (1988) verificaram correlação positiva entre a quantidade de IgG2 do leite de vacas e os índices de fagocitose de bactérias por neutrófilos sanguíneos.

A liberação de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos do colostro pode ter sido influenciada por partículas sólidas presentes no colostro, como aquelas de gordura e caseína, hipótese relacionada ao maior número de neutrófilos no colostro colhido antes da segunda ordenha e menor liberação de peróxido de hidrogênio. No entanto, a atividade bactericida indireta em presença da ECET foi superior àquela do ensaio controle (C) nas amostras de colostro obtidas antes da segunda ordenha, mostrando que talvez esta célula tenha maior capacidade de responder a estímulos bacterianos.

Barrio et al. (2003) investigaram a capacidade de opsonização de *Staphylococcus aureus* com IgG1, IgG2, IgA e IgM, sendo a IgM e IgG2 mais eficazes na opsonização da bactéria, facilitando a fagocitose e morte do microorganismo. Este fato foi sugerido no presente trabalho pela correlação positiva entre a quantidade de IgM e peróxido de hidrogênio produzidos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados alcançados nas condições estabelecidas pelo delineamento experimental para a avaliação da citologia, dos teores de imunoglobulinas e da atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino contra a ETEC, permitiram as conclusões apresentadas a seguir:

- a) O colostro bovino de segunda ordenha apresenta maior quantidade de células/mL, que aquele de primeira ordenha;
- b) A predominância celular demonstrada com o uso das técnicas de microscopia direta e de citocentrifugação foi de células mononucleares;
- c) O colostro bovino de segunda ordenha possui maior quantidade de neutrófilos polimorfonucleares, quando comparada àquela da primeira ordenha, utilizando as técnicas de microscópica direta e de citocentrifugação, para a contagem dos tipos leucocitários;
- d) Os tipos celulares predominantes no colostro bovino de primeira e segunda ordenha foram macrófagos/células epiteliais, seguidos por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, utilizando a técnica de citocentrifugação para diferenciação celular;
- e) O colostro bovino de primeira ordenha possui maiores teores de imunoglobulinas das classes G e M, que o da segunda ordenha, havendo predomínio da IgG, sobre a IgM e IgA independente da ordem de ordenha.
- f) Os fagócitos do colostro bovino de primeira ordenha apresentaram maior atividade celular avaliada pela liberação de peróxido de hidrogênio, que

- g) A estimulação antigênica com ECET não foi suficiente para aumentar a atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino;
- h) A opsonização da ECET com soro colostrado não determinou diferenças significativas na atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino, mensurada pela quantidade de peróxido de hidrogênio liberado por estas células;
- i) Existe correlação positiva entre os teores de imunoglobulinas da classe M e a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos do colostro bovino.
- j) O comportamento quantitativo observado para as imunoglobulinas e células do colostro bovino, considerando a ordem das ordenhas, sugere que os anticorpos teriam função prioritária na imunidade do neonato, enquanto o aumento de neutrófilos estaria voltado aparentemente para a proteção da glândula mamária.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 354 p.

ALDRIDGE, B. M.; MCGUIRK, S. M.; LUNN, D. P. **Effect of colostral ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves**. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 62, p. 51-64, 1998.

ASCON, M. A.; OCHOA-REPARAZ, J.; WALTERS, N.; PASCUAL, D. W. Partially assembled K99 fimbriae are required for protection. *Infection Immunology*, v. 73, n. 11, p. 7274-7280, 2005.

BARRINGTON, G. M.; PARRISH, S. M. Bovine Neonatal Immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 17, n. 03, p. 463-477, 2001.

BARRIO, M. B.; RAINARD, P.; GILBERT, F. B.; POUTREL, B. Assessment of the opsonic activity of purified bovine sIgA following intramammary immunization of cows with *Saphylococcus aureus*. *Journal Dairy Science*, v. 86, p. 2884-2894, 2003.

BELLINATI-PIRES, R.; MELKE, S. E.; COLLETO, G. M. D. D.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Evolution of fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions. *Journal Immunology Methods*, v.119, p. 189-96, 1989.

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

BESSER, T. E. Concentrations of passively acquired Ig G1 antibodies lumen of the neonatal calf. *Veterinary Immunology and Immunopatology*, v. 38, p. 103-112, 1993.

BESSER, T. E.; OSBORN, D. Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G1 to newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v. 37, p. 321-327, 1993.

BIANCHI, A. J. E.; BUTLER, J. E.; HOORFAR, J.; HOWARD, C.; LIND, P. Immunoglobulins and Fc receptors. **Veterinary Immunology Immunophatology**, v. 54, p. 25-31, 1996.

BROOKS, H. J.; MCCONNELL, M. A.; CORBETT, J.; BUCHAN, G. S.; FITZPATRICK, C. E.; BROADBENT, R. S. Potential prophylactic value of bovine colostrums in necrotizing enterocolitis in neonates: an in vitro study on bacterial attachment, antibody levels and cytokine production. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 48, n. 03, p. 347-354, 2006.

BUESCHER, S. E.; MCLLHERAN, S. M. Polymorphonuclear leukocytes and human colostrum: effects of in vivo and in vitro exposure. **Journal Pediatric Gastroenterology Nutricional**, v. 17, p. 424-433, 1993.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

CROSS, M. L.; GILL, H. S. Immunomodulatory properties of milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. S 81-S89, 2000. Supplement, 1.

DAHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic cells count in bovine milk. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 119-125, 1982.

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

DEVERY-POCUS, J. E.; LARSON, B. L. Age and previous as factor in the amount of bovine colostrum immunoglobulins. **Journal Dairy Science**, v. 66, p. 221-226, 1983.

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

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; WEINLAND. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 1247-1251, 1982.

ESTRELLA, S. L. G. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas com alta contagem de células somáticas**. 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H.; MENDES, L. C. N.; PERRI, S. H. V. Relação entre a concentração de imunoglobulinas colostrais e a transferência de imunidade passiva para bezerros da raça Holandesa após ingestão voluntária de colostro. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v. 2, n. 3, p. 160-168, 1999.

GAY, C. C.; BESSER, T. E. Colostrum and feeding management of dairy calf during the first two day of life. In: NAYLOR, J. M.; RALSTON, S. L. **Large Animal Clinical Nutrition**, St Louis: Mosby, 1991, p. 243-247.

GREWALL, A. S.; ROUSE, B. T.; BABIUK, L. A. Characterization of surface receptors on bovine leukocytes. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 56, p. 289-300, 1978.

GUIDRY, A. J.; PAAPE, M. J.; PEARSON, R. E.; WILLIAMS, W. F. Effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, p. 1427-1431, 1980.

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

HE, F.; TUOMOLA, E.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrums. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 93-96, 2001.

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

- HONORIO, A. C. **Atividade microbicida dos fagócitos do colostro humano para a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Mecanismo de ativação celular pela IgA do próprio colostro.** São Paulo, 1998. 177 f. Tese (Doutorado em Imunologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- HOWARD, C. J.; TAYLOR, G.; BROWNLIE, J. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. **Research Veterinary Science**, v. 29, p. 128-130, 1980.
- ISLAM, SK. N.; AHMED, L.; KHAN, MD. N. I.; HUQUE, S.; BEGUM, A.; YUNUS, A. B. M. Immune components (IgA, IgM, IgG e immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. **Pediatrics International**, v. 48, p. 543-548, 2006.
- JENSEN, D. L.; EBERHART, R. J. Total e differential cell count in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, n. 05, p. 743-747, 1981.
- KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. S75-S80, 2000. Supplement, 1.
- LAMOTTE, M. S.; EBERHART, R. J. Blood neutrophil phagocytosis, and plasma corticosteroids in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 37, n. 10, p. 1189-1193, 1976.
- LARSON, B. L.; LEARY, H. L.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production by the mammary gland. **Journal Dairy Science**, v. 63, p. 665, 1980.
- LASCELLES, A. K. The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. **Journal Dairy Sciences**, v. 62, p. 154, 1979.
- LEE, C.; WOODING, F. B.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v. 47, p. 39-50, 1980.
- LOMBARDO, P. S. M. S.; TODHUNTER, D. A. B. S.; SCHOLZ, R. W.; EBERHART, R. J. Effect of colostrum ingestion on indices of neutrophil phagocytosis and newborn calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 40, n. 3, p. 362-368, 1979.

MADUREIRA, K. M. **Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híbridas criadas no Estado de São Paulo**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, p. 235, 1965.

MARGATHO, L. F. F. AVILA, F. A. Respostas sorológicas de bovinos à vacina experimental contra a colibacilose e salmonelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 43-49, 2003.

MCDONALD, J. S.; ANDERSON, A. J. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. **American Journal Veterinary Research**, v. 45, n. 8, p. 1.366-1.368, 1981.

MCGUIRE, T. C.; MUSOKE, A. J.; KURTII, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology**, v. 38, p. 249-256, 1979.

MEE, J. F.; O'FARREL, K. J.; REITSMA, P.; MEHRA, R. Effect of a whey protein concentrate used as a colostrums substitute or supplement on calf immunity, weight gain, and health. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 886-894, 1996.

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 Immunophatology**, v. 62, p. 309-321, 1998.

MESTECKY, J.; MCGHEE, J. R. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactins involved IgA biosynthesis and immune response. **Advances in immunology**, v. 57, p. 1928-35, 1987.

MEYNELL, G. G.; MEYNELL, E. **Theory and Practice in experimental bacteriology**, 1 ed. London: Cambridge University Press, 1965, p. 12-24.

MILLER, R. H.; GUIDRY, M. J.; PAAPE, M. J.; DULIN, A. M.; FULTON, L. A. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, p. 42-

45, 1988.

MILLER, R. H.; PAAPE, M. J.; DULIN, A. M. Relationship between immunoglobulin concentration in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 42-45, 1985.

MILLER, R. H.; PAAPE, M. J.; FULTON, L. A. Variations in milk somatic cells of heifers at first calving. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 3782-3790, 1991.

MINITAB – **The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education** – 13.0 Release. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.

MOON, H. W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. **Journal of the American Veterinary Medicine**, v. 172, n. 4, p. 443-448, 1978.

MORIN, D. E.; MCCOY, G. C.; HURLEY, W. L. Effects of quality, quantity and timing feeding and addition of a dried colostrums supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 747-753, 1997.

MULLER, L. D.; ELLINGER, D. K. Colostral immunoglobulin concentration among breeds of dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 64, p. 1727-1730, 1981.

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

NAGY, B.; FEKETE, P. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v. 30, p. 259-284, 1999.

ÖSTENSSON, K. **Trafficking of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder**. Studies of milk, lymph and blood from cows with healthy and mastitic mammary glands. Uppsala, Sweden, 1993. 67 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences, 1993.

OYENIYI, O. O.; HUNTER, A. G. Colostral constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. **Journal Dairy Science**, v. 61, p. 44-48, 1978.

- PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, p. 597-627, 2003.
- PAAPE, M. J.; GILDY, A. J.; JAIN, N. V.; MILLER, R. H. Leukocytic defense mechanisms in the udder In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSON, G.; HILL, A. W. **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Belgium: 1991, p. 95-105.
- PAAPE, M. J.; HAFS, H. D.; SNYDER, W. W. Variations of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright's stains or Pyronin Y-methyl green stain. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 11, p.1211-1216, 1963.
- PABST, R.; ROTHKÖTTER, H. J. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 167-173, 1999.
- PARREÑO, V.; BÉJAR, C.; VAGNOZZI, A.; BARRANDEGUY, M.; COSTANTINI, V.; CRAIG, M. I.; YUAN, L.; HODGINS, D.; SAIF, L.; FÉRNANDEZ, F. Modulation by colostrums-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 7-24, 2004.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cell in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980.
- PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal Immunology Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.
- PFISTER, K.; JABER, P.; WOLFENDER, F.; CAREL, S. Ein neues spezifisches Immunglobulinpräparat für die Prophylaxe von neonatalen Kälberdurchfällen. **Tierärztliche Praxis**, 28, p. 260-263, 2000.
- PITT, J.; BARLOW, B.; HEIRD, W. C. Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk. **Pediatric Research**, v. 11, p. 906-909, 1977.

PONTES, G. N. **Avaliação da atividade fagocitária e microbicida de células do colostro humano para *Salmonella typhimurium***. São Paulo, 1999. 114 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infection Disease**, n. 7, p. 632-640, 1910.
RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**, 10 th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

RAIMONDO, R. F. S. **Características físico-químicas e celulares do leite de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo durante o primeiro mês de lactação: determinação dos valores de referência e das variações durante a fase colostrar**. São Paulo, 2006. 211f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RIEDEL-CASPARI, G. The influence of colostrar 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.

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

RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostrar leukocytes on the immune system of the neonatal calf. II Effects on passive and active immunization. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, p. 165-204, 1991b.

RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostrar leukocytes on the immune system of the neonatal calf. III Effects on phagocytosis. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, p. 325-364, 1991c.

RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostrar leukocytes on the immune system of the neonatal calf. IV Effects on bactericidity, complement and interferon. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, p. 395-398, 1991d.

- RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. Übersichtsreferat: Die Kolostralleukozyten und ihre Bedeutung für das Immunsystem des Neugeborenen. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 97, p. 137-192, 1991e.
- ROKKA, S.; KORHONEN, H.; NOUSIAINEN, J.; MARNILLA, P. Colostral whey concentrate supplement incrases complement ativity in the sera of neonatal calves. **Journal of Dairy Research**, v. 86, p. 357-367, 2001.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.
- ROTHKÖTTER, H. J.; PABST, R.; BAILEY, M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 157-165, 1999.
- RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C.; BARBUTO, J. A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brasilian Journal Medical Biological Research**, v. 22, n. 10, p. 1271-1273, 1989.
- SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 143-155, 1999.
- SAMPAIO, I. B. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 221 p.
- SANDGREN, C. H.; NORDLING, K.; BJÖRK, I. Isolation and phagocytic properties of neutrophils and other phagocytes from nonmastitic bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2965-2975, 1991.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Cary: SAS Institute, 2001, 956 p.
- SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971. 360 p.

SCHALM, O. W.; LASMANIS, J. The leukocytes: origin and function in mastitis **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 153, n. 12, p. 1688-1694, 1968.

SCHATTAUER, F. K. Klinisch-chemische blutwerte bei neugeborenen kälbern. **Tierärztliche Praxis**, v. 21, p. 295-231, 1993.

SCHULTZ, L. H. Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 10, p. 1244-1246, 1977.

SEGAL, A. W.; SOOTHILL, J. F. Phagocytes. In: SOOTHILL, J. F. **Pediatric immunology**. Oxford: Blackweel, 1983. p. 37.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica**. São Paulo: McccGeaw-Hill, 1975. 350 p.

SMITH, G. W.; FOSTER, D. M. Short communication: absorption of protein and immunoglobulin G in calves fed a colostrums replacer. **Jornal Dairy Science**, v. 90, p. 2.905-2.908, 2006.

SMITH, C. W.; GOLDMAN, A. S. The cells of human colostrums: in vitro studies of morphology and functions. **Pediatric Research**, v. 2, p. 103, 1968.

SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1967. 593 p.

SOARES FILHO, P. M.; BELÉM, P. A. D.; RIBEIRO-JÚNIOR, J. I.; SALCEDO, J. H. P. Concentrações de imunoglobulinas G em colostro de vacas mestiças Holandês-Zebu. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1033-1037, 2001.

STEINHARD, M.; GOLLNAST, I.; LANGANKE, M.; BÜNGER, U.; KUTSCHKE, J. Klinisch chemische blutwerte bei neugeborenen kälbern. **Tierärztliche Praxis**, v. 21, p. 295-301, 1993.

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

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002, 532 p.

TYLER, J. W.; CULLOR, J. S.; THURMOND, M. C.; DOUGLAS, V. L.; DELLINGER, J. D. Humoral response in neonatal calves following immunization with *Escherichia coli* (strain J5); the effects of adjuvant, age and colostral passive interference. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 23, p. 333-344, 1989.

UGRINOVICH, L. A.; ÁVILLA, F. A.; OLIVEIRA, M. N.; CASTRO, A. F. P. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isolada de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal. **Ciência Rural**, v.32, n. 2, p. 289-291, 2002.

VAZ, A. K.; FURTADO, A. C.; MRCA, A.; PATERNO, M. R. Qualidade do colostro bovino e transferência de imunidade aos bezerros recém-nascidos na região leste de Lages – SC. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, n. 2, p. 116-120, 2004.

XU, L. B.; CHEN, L.; GAO, W.; DU, K. H. Bovine immune colostrum against 17 strains of diarrhea bacteria and in vitro and in vivo effects of its specific IgG. **Vaccine**, v. 24, p. 2131-2140, 2006.

WATSON, D. L. The effect of cytophilic IgG2 on phagocytosis by ovine polymorphonuclear leucocyte. **Immunology**, v. 31, p. 159-165, 1976.

WILLIAMS, M. R.; HILL, A. W. A role for IgM in the in vitro opsonisation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by bovine polymorphonuclear leucocytes. **Research Veterinary Science**, v. 33, p. 47-53, 1982.

ANEXOS

ANEXO 01

Tampão fosfato para lavagem das células

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	26,79g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	4,14g
NaCl.....	82g
Água Milli-Q qsp.....	1000mL

No momento do uso, esta solução de estoque (concentrada 10 vezes) deve ser diluída na proporção 1:10 em água Milli-Q, mantendo-se o pH da solução final entre 7,2-7,4.

ANEXO 2

Corante de Rosenfeld

Giemsa em pó.....	0,97g
May Grunwald em pó...	0,53g
Metanol P.A. qsp.....	1000mL

Deixar dissolver durante 02 dias e depois filtrar.

ANEXO 03

Meio Líquido BHI

Meio BHI Desidratado.....37g

Água Destilada.....1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Distribuir em frascos ou tubos estéreis.

ANEXO 4

Tampão fosfato para a lavagem de bactérias

NaCl.....8g

Fosfato monobásico de potássio.....0,2g

Na₂HPO₄·7H₂O.....2,8g

KCl.....0,2g

Água destilada q.s.p.....1000mL

Acertar o pH para 7,4

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

ANEXO 5

Meio de Cultura TSA

Meio de ágar com digerido de soja e caseína USP desidratado.....40g

Água destilada q.s.p.....1000mL

Aquecer com agitação frequente e ferver por 01 minuto até que o pó se dissolva completamente. Autoclavar 121 °C por 15 minutos.

ANEXO 6

Agar Nutriente Estoque

Agar.....3g
Caldo Nutriente.....5g
Cloreto de sódio.....4g
Água destilada.....500 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

ANEXO 7

Preparo da Solução de Fenol Vermelho

Peroxidase concentração 5 mg/mL PBS
Pegar 100 µL desta solução e acrescentar
À 900 µL de PBS.....0,1 mL
Solução A.....0,8 mL
Solução B.....0,1 mL
Solução C.....0,1 mL
“Phenol Red Solution” 0,5 %.....0,2 mL
Glicose 10%.....0,1 mL
Água Milli-Q.....8,6 mL

Solução de Peroxidase

Pesar 5 mg e diluir em 1 mL de PBS. Desta solução, pegar 100 µL e diluir em 900 µL de PBS. Aliquotar 100 µL em ependorf embalados em papel alumínio para estar pronta para uso.

Preparo da Solução A

NaCl.....80.0g
KCl.....2.0g
NA₂HPO₄.7H₂O....21.5g
KH₂PO₄.....2g

Água Milli-Q.....800 mL

Preparo da Solução B

CaCl₂.2H₂O.....1,3g

Água Milli-Q.....100 mL

Solução C

MgCl₂.6H₂O.....2,1g

Água Milli-Q.....100 mL

Preparo da Solução de Glicose

Glicose10g

Água Milli-Q.....100 mL