CAROLINA DE LARA SHECAIRA

Avaliação da transferência de citocinas para o sangue de neonatos via
ingestão de colostro de fêmeas bovinas Holandesas

São Paulo

2013

CAROLINA DE LARA SHECAIRA

Avaliação da transferência de citocinas para o sangue de neonatos via ingestão de colostro de fêmeas bovinas Holandesas.

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

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Prof. Dr. Fernando José Benesi

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2013

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033352

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.2883
FMVZ

Shecaira, Carolina de Lara
Avaliação da transferência de citocinas para o sangue de neonatos via ingestão de colostro de fêmeas bovinas Holandesas. / Carolina de Lara Shecaira. -- 2013.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Bezerros neonatos . 2. Transferência de imunidade passiva. 3. Citocinas. 4. Gado Holandês. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

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

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

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SHECAIRA, Carolina de Lara.

Título: Avaliação da transferência de citocinas para o sangue de neonatos via ingestão de colostro de fêmeas bovinas Holandesas.

Dissertação 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 Mestre em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A todos os animais que foram instrumento desta pesquisa e de tantas outras, possibilitando o desenvolvimento da Medicina Veterinária, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me sustenta todos os dias.

Ao meu Orientador Professor Titular Fernando José Benesi, pela confiança em mim depositada, por acreditar em minha capacidade e por muitas vezes ter feito um papel de pai para mim.

À professora Dra. Karina Medici Madureira pelo companheirismo, aprendizado e por toda ajuda fornecida, meu agradecimento especial!

À professora Dra Viviani Gomes, por todos os ensinamentos, e pela doação dos soros dos bezerros do grupo G1, meu agradecimento especial!

A toda a equipe da qual faço parte: Rogerio Santos Batista, Juliana Aparecida Bombardelli, Heitor Amaral e Clara Lupatinni, em especial à Caroline Harumi Seino, eu não teria conseguido sem vocês! Não tenho palavras para agradecer

À Fazenda Colorado por ter cedido os bezerros, sem os quais esse projeto não existiria.

A todos os bezerros que fizeram parte deste projeto, esse agradecimento é mais do especial, sem vocês este trabalho jamais seria possível. Minha gratidão eterna, a estes animais que me serviram como instrumento de trabalho!

Ao colega Giancarlo pela doação dos colostros.

Ao Professor Dr. Francisco Rennó pela doação do leite em pó.

A todos os colegas de pós-graduação e em especial: Ao Dudu por ter me recebido em Pirassununga, dividido o trabalho e o cuidado dos bezerros. Muito obrigada mesmo!

À memória dos meus avós Wadih e Jacyra, pelo caráter, honestidade e solidariedade, características que eu procuro sempre seguir.

Ao meu pai Issa por ter me ensinado o gosto pelo estudo e não ter medido esforços para a minha educação.

À minha mãe Roberta, por gentilmente ter me abrigado em seu ventre, por ser minha amiga.

Aos meus irmãos Mariana e Ramon, por serem meus grandes amigos.

Aos meus queridos tios Wadih e Jacira por todo o apoio e incentivo.

Aos meus avós Elza e Roberto pelo carinho.

À minhas tias Helena e Elza por todo o amor que sempre me dedicaram.

Aos meus primos: Laura, Tânia, Beto, Gabriel e Luana por todos os anos de companheirismo.

À minha querida tia Odilla por gentilmente aliviar a falta de minha avó.

Ao meu primo Giuseppe, à Cleide e Ângela, que me acolheram e me ajudaram no meu começo de vida em São Paulo.

Ao meu amigo Leôncio, por ter me incentivado quando esse mestrado era só um sonho e por ter me mostrado um mundo novo.

Aos amigos Priscilla, Gustavo, Marcela, Fernanda, Mayna, Mariana, Nayara e Giovanni por fazer a vida na Babilônia mais feliz.

Ao meu amigo Keith por todos os bons conselhos e risadas.

Aos meus amigos da irmandade por todo o apoio incondicional,

Ao Murilo, por toda a paz que você me traz, por me tratar com tanto carinho e por toda a ajuda fornecida para a realização deste trabalho.

Aos graduandos Vinícius e Raquel pela amizade e ajuda no cuidado dos bezerros.

Aos residentes: Camila, Marcela, Bruno, Rodrigo e em especial a Gabriela.

Ao pós graduando Fernando Marques pela ajuda com a estatística.

Ao professor Dr. Humberto Hammad pela ajuda com a estatística.

A todos os professores do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/USP, em especial à querida professora Dra Alice M.P.M. Della Libera, por todo o apoio e carinho, e ao professor Dr. Fábio Celidônio Pogliani por todas as perguntas sanadas e por sua sincera amizade.

À Claudia Regina Sticagnolo, técnica do Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, por toda essencial ajuda, meus mais sinceros agradecimentos.

Às técnicas de laboratório; Samantha, Mau, Maria Helena e em especial à Clara.

Aos funcionários do Hospital de Ruminantes por sempre nos serem solícitos.

Aos funcionários da biblioteca “Virginie Buff D’apice” sempre muito solícitos.

À funcionária Dinha pelo auxílio na lavagem de materiais.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP em especial à Aparecida, Carolina e Silvana.

À FAPESP pelo auxílio nº 2009/10394-0 e pela bolsa nº 2011/16520-8 que nos permitiu a realização deste trabalho.

Enfim a todos que me ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

SHECAIRA, C. L. **Avaliação da transferência de citocinas para o sangue de neonatos via ingestão de colostro de fêmeas bovinas Holandesas.** [Evaluation of the transfer of cytokines to the blood of neonates by colostrum ingestion of holstein females]. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O nascimento de um bezerro é marcado pela passagem de um meio estéril, para um ambiente contaminado, aliado o fato da placentação (sindesmocorial), que não permite a passagem de anticorpos durante a gestação e sem um sistema imunológico desenvolvido funcionalmente, o neonato necessita da ingestão do colostro para lhe conferir imunidade nos primeiros dias de vida. Além das imunoglobulinas o colostro possui leucócitos, e citocinas que parecem participar do estabelecimento da imunidade neonatal. Apesar da potencial importância desses componentes do colostro, poucos são os estudos que avaliaram a transferência das citocinas do colostro bovino e seu papel na imunidade neonatal, razão pelo qual esse projeto teve como seguintes objetivos: mensurar as concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ presentes no soro de bezerros neonatos da raça Holandesa e avaliar a interferência do manejo do colostro bovino e do seu oferecimento, ou não, sobre as concentrações dessas citocinas no soro desses bezerros, durante os 15 primeiros dias pós-nascimento. Utilizaram-se bezerros nascidos de parto eutócico e distribuídos igualmente por três grupos experimentais (n=5): G1- receberam 4 litros de colostro fresco provenientes de suas próprias mães; G2- receberam 4 litros de colostro provenientes de “pool” de colostro congelado e o G3- foram alimentados apenas com leite. Para a avaliação das citocinas referidas no soro dos bezerros, foram feitas cinco coletas de sangue durante os quinze primeiros dias de vida pós-nascimento (p.n.): T0 (antes da primeira ingestão de colostro ou leite); T1 (1 a 2 dias p.n.); T2 (3 a 4 dias p.n.); T3 (5 a 6 dias p.n.) e T4 (10 a 15 dias p.n.). Também mensurou-se as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante do colostro fornecido aos bezerros do grupo G1, e citocinas TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-6 no sobrenadante do “pool” de colostro fornecido aos bezerros do grupo G2. Os bezerros do grupo G1 apresentaram valores detectáveis para as citocinas referidas, atingindo picos nos tempos T1(2 a 3 dias p.n.) ou T2 (3 a 4 dias p.n.) enquanto que

os bezerros do grupo G2 apresentaram valores detectáveis apenas para o tempo T3(5 a 6 dias p.n.) para a citocina IL-6, enquanto que os bezerros do grupo G3, não apresentaram concentrações detectáveis para nenhuma citocina mensurada com exceção da citocina IL-1 β no tempo 4 (10 a 15 dias p.n.). Com base nos resultados encontrados nesta pesquisa foi possível: (a) verificar a transferência de citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ para o soro de bezerros do grupo G1 via ingestão de colostro fresco. (b) verificar a transferência de citocina IL-6, para a circulação de bezerros do grupo G2, via ingestão de “pool” de colostro. (c) verificar que bezerros recém-nascidos privados de colostro (G3) não apresentaram concentrações detectáveis de citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ nos primeiros quinze dias de vida, demonstrando que concentrações detectáveis das citocinas em questão provêm do colostro. (d) verificar que o grupo de bezerros que recebeu colostro de suas próprias mães (G1) obteve maior concentração de citocinas que o grupo que recebeu “pool” de colostro (G2), demonstrando que as células leucocitárias presentes no colostro fresco são capazes de expressar citocinas no sangue periférico de bezerros recém-nascidos até 15 dias pós-nascimento.

Palavras-chave: Bezerros neonatos. Transferência de imunidade passiva. Citocinas. Gado Holandês.

ABSTRACT

SHECAIRA, C. L. Evaluation of the transfer of cytokines to the blood of neonates by colostrum ingestion of Holstein females. [Avaliação da transferência de citocinas para o sangue de neonatos via ingestão de colostro de fêmeas Holandesas]. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The birth of a calf is marked by the passage of a sterile environment to a contaminated environment, coupled with the fact of placentation (sindesmocorial), which does not allow the passage of antibodies during pregnancy and without an immune system developed functionally, the needs of the neonate ingestion of colostrum to give it immunity during the first days of life. Besides the colostrum immunoglobulin has leukocytes and cytokines that seem to participate in the establishment of neonatal immunity. Despite the potential importance of these components of colostrum, there are few studies evaluating the transfer of cytokines from colostrum and its role in neonatal immunity, reason why this project had the following objectives: to measure the concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ in the serum of newborn Holstein calves and evaluate the interference of bovine colostrum management and of its offering, or not, on the concentrations of these cytokines in the serum of these calves during the first 15 days after birth. We used calves born from normal delivery and equally divided into three experimental groups (n = 5): G1 - received 4 liters of fresh colostrum from their mothers; G2- received 4 liters of colostrum from a "pool" of frozen colostrum and G3- were fed only milk. For the evaluation of these cytokines in the serum of calves, blood collections were made during the first fifteen days of postnatal life (p.n.): T0 (before the first intake of colostrum or milk), T1 (1st 2 days p.n.), T2 (3 to 4 days p.n.), T3 (5 to 6 days p.n.) and T4 (10 to 15 days p.n.). Also measured is the cytokine TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant of colostrum fed to calves in group G1, and cytokines TNF- α , IL-1 β , IFN- γ and IL-6 in supernatant "pool" of colostrum fed to calves in G2. Calves from G1 group had detectable values for these cytokines, reaching peaks at T1 (2 to 3 days p.n.) or T2 (3 to 4 days p.n.) while calves in G2 showed detectable values only for the period T3 (5 to 6 days p.n.) for the cytokine IL-6, whereas the calves of group G3 did not show any detectable for cytokine concentrations measured with the

exception of IL- 1 β 4 time (10 to 15 days p.n.). Based on findings of this study it was possible to: (a) verify the transfer of IL- 6, IL- 1 β , TNF- α and IFN- γ in the serum of calves from G1 via ingestion of fresh colostrum. (b) verify the transfer of cytokine IL -6 into the circulation of calves in G2 via ingestion of "pool" of colostrum. (c) verify that deprived newborn calves colostrum (G3) showed no detectable concentrations of IL - 6 , IL- 1 β , TNF- α and IFN- γ in the first fifteen days of life , demonstrating that detectable concentrations of cytokines in question come from the colostrum. (d) verify that the group of calves that received colostrum from their mothers (G1) had higher cytokine concentrations than the group that received "pool" of colostrum (G2), demonstrating that leukocytes present in fresh colostrum are able to express cytokines in peripheral blood of newborns up to 15 days after birth calves

Keywords: Newborn calves. Transfer of passive immunity. Cytokines. Holstein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Alimentação via mamadeira.....	43
Figura 2 -	Componentes do kit comercial para ELISA, BD-Biosciences®. Juntamente com placa de poliestireno Nunc®	48
Gráfico 1 -	Representação gráfica da concentração mediana da citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	52
Gráfico 2 -	Representação gráfica das concentrações da citocina IL-1 β (IL-1 β), em pg/mL no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	52
Gráfico 3 -	Representação gráfica das concentrações da citocina IL-6 (IL-6) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	55
Gráfico 4 -	Representação gráfica das concentrações da citocina IL-6 (IL-6) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	55
Gráfico 5 -	Representação gráfica da concentração mediana da citocina Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) em pg/mL, no soro de bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	58
Gráfico 6 -	Representação gráfica das concentrações da citocina Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	58
Gráfico 7 -	Representação gráfica da concentração mediana da citocina Interferon-gama (IFN- γ) em pg/mL, no soro de bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	61
Gráfico 8 -	Representação gráfica das concentrações da citocina Interferon-gama (IFN- γ) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) em pg/mL nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	51
Tabela 2 -	Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis	53
Tabela 3 -	Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Interleucina-6 (IL-6) em pg/mL, nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	54
Tabela 4 -	Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Interleucina-6 (IL-6) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis	56
Tabela 5 -	Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	57
Tabela 6 -	Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis	59
Tabela 7 -	Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Interferon- gama (IFN- γ) em pg/mL, nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4	60
Tabela 8 -	Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Inteferon-gama (IFN- γ) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis	62
Tabela 9 -	Comparação das concentrações medianas das citocinas TNF-alfa, IL-1 beta e IL-6 no sobrenadante dos colostros fornecidos ao grupo G1 com a concentração das citocinas TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 mensuradas no “pool” de colostro fornecido ao grupo G2	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Con-A	Concanavalina-A
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês: <i>Enzyme linked Imuno Sorbet Assay</i>)
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
p.n.	Pós nascimento
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
g/G	Força gravitacional
μL	Microgramas
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
Ng	Nanograma
Pg	Picograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	IMUNIDADE DO BEZERRO RECÉM- NASCIDO	22
2.2	COMPONENTES IMUNOLÓGICOS DO COLOSTRO	25
2.2.1	Imunoglobulinas	25
2.2.2	Leucócitos	26
2.2.3	Citocinas	29
2.2.3.1	Citocinas avaliadas	29
2.2.3.1.1	<i>Interleucina -1 beta(IL-1β)</i>	30
2.2.3.1.2	<i>Interleucina -6 (IL-6)</i>	30
2.2.3.1.3	<i>Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α)</i>	31
2.2.3.1.4	<i>Interferon-gama (IFN-γ)</i>	32
2.2.3.2	Citocinas do colostro e seu papel na imunidade do recém-nascido ..	32
2.3	MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DOS COMPONENTES IMUNOLÓGICOS MATERNS	36
2.4	MANEJO COLOSTRAL E SUA INTERFERÊNCIA NOS TEORES DE IMUNOGLOBULINAS, LEUCÓCITOS E CITOCINAS.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
3.2	ANIMAIS UTILIZADOS	40
3.3	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	41
3.4	ADEQUAÇÃO DAS INSTALAÇÕES	42
3.5	ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS	42
3.6	COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	43
3.7	OBTENÇÃO DAS ALIQUOTAS DE SORO SANGUÍNEO	44
3.8	COLHEITA DAS AMOSTRAS DE COLOSTRO DAS FÊMEAS HOLANDESAS E DO “POOL” DE COLOSTRO.....	44
3.9	OBTENÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO SOBRENADANTE DO COLOSTRO	45
3.10	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO COLOSTRO	46

3.11	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS	46
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
5.1	CITOCINAS NO SORO DOS BEZERROS DOS GRUPOS G1, G2 E G3, AVALIADAS NOS TEMPOS T0, T1, T2, T3 E T4	50
5.1.1	Interleucina-1 beta (IL-1β)	50
5.1.2	Interleucina-6 (IL-6)	53
5.1.3	Fator de Necrose tumoral-alfa (TNF-α)	56
5.1.4	Interferon gama (IFN-γ)	59
5.2	CITOCINAS NO SOBRENADANTE DO COLOSTRO DAS FÊMEAS HOLANDESAS GENITORAS DOS BEZERROS DO GRUPO G1 E DO “POOL” DE COLOSTRO	62
6	DISCUSSÃO	64
6.1	CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DO COLOSTRO DAS MÃES E NO “POOL” DE COLOSTRO FORNECIDO AOS BEZERROS DOS GRUPOS G1 E G2 RESPECTIVAMENTE	66
6.2	CITOCINAS PRESENTES DO SORO SANQUÍNEO DOS BEZERROS DOS GRUPOS G1, G2 E G3	67
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O adequado estabelecimento da imunidade num organismo vivo é imprescindível a sua sobrevivência e apresenta um verdadeiro desafio à prole bovina, devido as particularidades da placentação nas fêmeas dessa espécie (MOREIN; ABUSUBRA; BLOMQVIST, 2002; CHASE; HULEY; REBER, 2008; TIZARD, 2008).

Durante a gestação, o feto bovino desenvolve mecanismos de defesa: imunes e não imunes (BARRINGTON; PARISH, 2001). Estes mecanismos podem ser dependentes de reconhecimento de antígeno, como aqueles para a produção dos anticorpos e que permitem a ação dos linfócitos, sendo no caso, chamado de imunidade adquirida ou específica; ou independentes desse reconhecimento antigênico, denominado imunidade inata ou inespecífica (CHASE; HULEY; REBER, 2008; TIZARD, 2008).

Apesar de presentes no neonato, os constituintes do sistema imunológico e os seus recursos em bezerros, são limitados funcionalmente após o nascimento não sendo capazes de responder plenamente aos estímulos antigênicos (TIZARD, 2008), pois seu sistema imunológico ainda não teve exposição antigênica anterior, sendo considerado virgem (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Outra particularidade dos neonatos ruminantes é que eles nascem desprovidos de teores suficientes de imunoglobulinas (hipo ou agamaglobulinêmicos) (RADOSTITS et al., 2007; TIZARD, 2008), situação decorrente da constituição tecidual placentária das fêmeas, denominada sindesmocorial, que forma um sincício entre o trofoderma fetal e o endométrio materno, evitando a possibilidade do contato do sangue materno com o fetal e impedem a passagem de anticorpos da mãe para o feto durante a gestação (WEAVER et al., 2000).

Por essas particularidades, o primeiro mês de vida dos bezerros é caracterizado por vulnerabilidade imunológica (CHASE; HURLEY; REBER, 2008) estando esses neonatos mais susceptíveis aos diversos patógenos causadores de enfermidades características dessa faixa etária, tais como a diarreia, afecções umbilicais e doenças respiratórias.

Na ausência de resposta imune adequada, o colostro constitui o suporte de imunidade humoral, sendo o principal provedor de imunidade passiva específica durante os primeiros dias de vida do bovino recém-nascido. Estudos recentes têm demonstrado que o papel do colostro não se restringe ao fornecimento de anticorpos específicos, mas também é participante ativo na construção da resposta imune celular, com o fornecimento de leucócitos e citocinas que são essenciais na otimização desta resposta (RIEDEL-CASPARI, 1993; GOTO et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001; REBER et al., 2008a,b).

Em particular, a transferência de algumas citocinas via colostro para os bovinos recém-nascidos foi descrita por alguns autores (GOTO et al., 1997; HAGIWARA et al., 2000; YAMANAKA et al., 2003; MUNETA et al., 2004; OHTSUKA et al., 2006; MADUREIRA, 2011), no entanto seu papel no estabelecimento e regulação da imunidade celular nesses neonatos ainda não está totalmente elucidado.

Outro fator importante quanto aos teores de imunoglobulinas, leucócitos e citocina do colostro, é o manejo. Diferentes manejos do colostro como irradiação gama, congelamento, aquecimento, pasteurização e formação de "pools" podem diminuir sua qualidade (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998; GODDEN, 2008; DONAHUE et al., 2012), fazendo com que este perca ou diminua sua função de suporte imunológico.

Visando auxiliar no esclarecimento do mecanismo de transferência de algumas citocinas colostrais aos bezerros recém-nascidos e a interferência do manejo do colostro, este trabalho teve como objetivos:

- a) Avaliar a transferência da Interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), da Interleucina-6 ($IL-6$), do Fator de necrose tumoral-alfa ($TNF-\alpha$) e do Interferon-gama ($IFN-\gamma$) presentes no colostro das fêmeas bovinas aos seus bezerros neonatos, por meio da determinação das suas concentrações no soro sanguíneo dos recém-nascidos, durante os primeiros quinze dias de vida.
- b) Determinar as taxas das citocinas $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ no soro de bezerros neonatos da raça Holandesa, após a ingestão de "pool" de colostro e em ausência da mamada de colostro, durante os primeiros quinze dias de vida e

- c) Avaliar a interferência do manejo do colostro bovino fresco “in natura” ou de “pool” e do seu oferecimento, ou não, nas concentrações de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ presentes no soro de bezerros da raça Holandesa, durante os primeiros quinze dias de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diversas são as doenças que acometem os bezerros recém-nascidos, destacando-se entre elas as diarreias, as onfalites e as doenças respiratórias, causadoras de grandes perdas e gastos com tratamentos (BENESI, 1993). O desenvolvimento adequado da resposta imune do bezerro é a chave para sua sobrevivência. No entanto, particularidades ocorridas durante a gestação, impedem que o bezerro nasça com essa resposta desenvolvida, tais como: nenhuma transferência de imunidade por via placentária, a influência hormonal a que é submetido no momento do parto e a imaturidade com incompleta funcionalidade do seu sistema imunológico quanto à rapidez em responder a antígenos, tornam o fornecimento de colostro de boa qualidade imunológica em volume e momento ideais essencial para sua imuno homeostase em um período de maior susceptibilidade desses neonatos às doenças que mais ocorrem nos primeiros dias após seu nascimento (MOREIN; ABUSUBRA; BLOMQVIST, 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; TIZARD, 2008).

O colostro bovino é uma secreção rica em nutrientes, sendo constituída por muitos componentes essenciais ao atendimento de diversas funções e necessidades dos neonatos, sendo a principal delas a transferência passiva de componentes imunológicos como imunoglobulinas, células e citocinas. O papel imunológico das imunoglobulinas e seu mecanismo de transferência são os pontos mais esclarecidos até o momento, quando se considera o papel do colostro na resposta imune dos bezerros recém-nascidos, entretanto, poucos trabalhos existem que estudaram a função das citocinas colostrais nesta imunidade (LE JAN, 1996; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; CORTESE, 2009; MADUREIRA, 2011).

Por esta razão optou-se abordar, nesta revisão de literatura o sistema imune do bezerro recém-nascido, os componentes imunológicos do colostro e seus mecanismos de transferência, com ênfase para as citocinas.

2.1 IMUNIDADE DO BEZERRO RECÉM-NASCIDO

Ao nascimento, a imunidade do bezerro passa por um período crítico. Os primeiros dias pós-nascimento (p.n.) são de crescimento e multiplicações celulares abundantes e de organização de diversas funções fisiológicas, atividades que se sucederão em um meio repleto de patógenos (LE JAN, 1996). Embora o feto seja protegido pela imunidade inata, mediada por neutrófilos e macrófagos, os hormônios séricos, principalmente o cortisol, liberados ao final da gestação e durante o trabalho de parto, diminuem essa proteção, pela queda da resposta do tipo Th1 ou seja, imunidade celular (BARRINGTON; PARISH, 2001; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; TIZARD, 2008; CORTESE, 2009). Caracterizando-se com este panorama um verdadeiro desafio ao seu sistema imune, que apesar de completo em seus componentes, ainda é funcionalmente imaturo.

As imunidades inata e adaptativa do bezerro logo após o nascimento possuem particularidades que propiciam susceptibilidade desse indivíduo aos microrganismos patogênicos. Quando se trata dos componentes humorais da imunidade inata existe um decréscimo na atividade do sistema complemento, que corresponde de 12 a 60% do que seria essa atividade no adulto, atingindo valores semelhantes somente aos seis meses de vida (CORTESE, 2009).

Os fatores celulares da imunidade inata também possuem suas peculiaridades: o número de neutrófilos é quatro vezes maior no bezerro recém-nascido do que no bovino adulto, no entanto, em contraposição a atividade bactericida dos neutrófilos e fagocitária dos macrófagos são reduzidas; o número de células dendríticas e a função das células *Natural Killer* (NK) também aparecem comprometidos nos primeiros dias pós-nascimento (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

A imunidade adquirida, durante a primeira semana pós-nascimento, também é deficiente, os linfócitos B no bezerro recém-nascido estão presentes em números bem inferiores, cerca de 4 % quando comparados ao dos espécimes adultos, onde esta porcentagem é de 20 a 30%. Outros componentes como os do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II e as células apresentadoras de antígenos também se encontram numericamente reduzidos (MOREIN; ABUSUBRA; BLOMQVIST, 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Os linfócitos T possuem proporção semelhante a do bovino adulto, na circulação do bezerro recém-nascido, a saber: 10% são células TCD8; 20% células TCD4; de 28 a 34% células do tipo CD3 e 25% células do tipo gama-delta (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). As células T gama delta possuem um papel protetivo em superfícies como epitélio intestinal, epiderme, língua, esôfago e traqueia (PERINO; RUPP, 1994). Várias subpopulações de linfócitos T colonizam o íleo de bezerros recém-nascidos logo após o nascimento, colaborando para o desenvolvimento da resposta imune local (WYATT et al., 1996).

Evidências demonstram que a imunidade do recém-nascido possua respostas do tipo Th2 (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002), devido a um aumento de linfócitos circulantes, porém tal resposta esta sem memória (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Esse deslocamento da resposta Th1 para a resposta Th2 é influenciado provavelmente por hormônios como prostaglandina E2, progesterona e por citocinas como IL-4 e IL-10 provenientes da placenta (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002). No entanto, em duas semanas de vida, a resposta imune celular se estabiliza, alcançando níveis próximos aos de bovinos jovens (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Entre 36 horas e três semanas de vida, o bezerro já consegue produzir cerca de 1g/dia de imunoglobulina G1, a IgM também pode ser produzida no intestino desde a primeira semana de vida, sendo predominante entre 3 e 5 semanas p.n., mais tarde essa predominância é substituída pela IgA (BARRINGTON; PARISH, 2001). Contudo, as imunoglobulinas, IgA, IgG1, e IgG2 só atingem valores suficientes entre 16 e 32 dias p.n. (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Com a ingestão do colostro, o bezerro recém-nascido, que é hipo ou agamaglobulinêmico (TIZARD, 2008), recebe uma grande quantidade de imunoglobulinas, células e citocinas, que servirão como apoio imune durante as primeiras semanas p.n (SENOGLES et al., 1978; TIZARD, 2008), diminuindo a mortalidade e a morbidade causadas por diversas doenças comuns aos recém-nascidos (BENESI, 1993; BESSER; GAY, 1994; TIZARD, 2008).

Afora os efeitos imunes, o colostro possui efeitos imunomodulatórios no organismo do recém-nascido, tais como maturação de monócitos e recrutamento de linfócitos (CHASE; HURLEY; REBER, 2008; REBER et al., 2008a).

Ao analisar subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo no baço de ratos imunossuprimidos suplementados por via oral com colostro pode-se notar que

a suplementação foi capaz de desencadear efeitos imunomodulatórios nessas subpopulações esplênicas de linfócitos T e produção de citocinas (WAN et al., 2010).

A ingestão de leucócitos colostrais pelo bezerro recém-nascido auxilia a maturação dos monócitos, aumentando sua capacidade de reconhecer antígenos, via regulação de MHC de classe I (REBER et al., 2008a), e também reduz os marcadores de ativação de linfócitos e estresse fisiológico geral (REBER et al., 2008b).

Quanto à ingestão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , estas são capazes de recrutar linfócitos e contribuir para o desenvolvimento da resposta imune do bovino recém-nascido (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

O colostro fornece componentes imunes e imunomoduladores que auxiliam o recém-nascido a sobreviver neste período de debilidade, contribuindo para o estabelecimento de sua homeostase (SALMON et al., 2009). Por outro lado, esta capacidade imunomodulatória pode bloquear temporariamente a capacidade do bezerro recém-nascido de estruturar suas respostas (MENANTEAU-HORTA et al., 1985), inibindo o aperfeiçoamento do seu sistema imune, por meio da inibição temporária da síntese ativa de imunoglobulinas (BARRINGTON; PARISH, 2001; TIZARD, 2008; CORTESE, 2009).

No soro de bezerros que não mamaram colostro após uma semana pós-nascimento já se observa a presença de imunoglobulinas, enquanto que nos que o mamaram essa síntese ocorre mais tardiamente, por volta de quatro semanas p.n. (BORGES, 1997; TIZARD, 2008), impedindo a imunização ativa por meio de vacina ou exposição a patógenos (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002; CORTESE, 2009).

Esse período refratário dependerá da quantidade de imunoglobulinas recebidas via colostro e de sua meia-vida. Os teores de imunoglobulinas maternas podem manter-se elevados o suficiente para bloquear os antígenos vacinais, mas não para fazê-lo em casos de infecções naturais (CHASE; HURLEY; REBER, 2008), tornando o desenvolvimento da resposta imune adquirida associada à vacinação, um desafio (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002).

2.2 COMPONENTES IMUNOLÓGICOS DO COLOSTRO

O colostro é uma secreção produzida pelas glândulas mamárias de fêmeas durante o parto, pela influência de hormônios lactogênicos (WATTIAUX, 1996; URUAKPA; ISMOND; AKOBUNDU, 2002; GODDEN, 2008).

Quanto aos seus componentes imunológicos, o colostro possui imunoglobulinas, células e citocinas (URUAKPA; ISMOND; AKOBUNDU, 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; GOMES, 2008; CORTESE, 2009; STELWAGEN et al., 2009). A necessidade da ingestão do colostro pelo bezerro recém-nascido é incontestável. A transferência de imunidade passiva via placenta é mínima ou inexistente, tornando o colostro o maior fornecedor dessa imunidade em bezerros (SENOGLES et al., 1978; BENESI, 1993; TIZARD, 2008; CORTESE, 2009).

2.2.1 Imunoglobulinas

O colostro bovino contém altos teores de imunoglobulina G (IgG) e A (IgA) e taxas menores de imunoglobulinas E (IgE) e M (IgM.) As IgGs correspondem a cerca de 65 a 90% de todas as imunoglobulinas colostrais (TIZARD, 2008). A ingestão de colostro com altas taxas de imunoglobulinas diminui a ocorrência de enfermidades neonatais determinadas por patógenos como diarreia, doenças respiratórias e onfalites (BENESI, 1993; BESSER; GAY, 1994).

Segundo Soares Filho et al. (2001), o colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa possui em média 145,94 mg/mL de IgG. Cálculos realizados por Gomes (2008), indicaram que as IgG, IgA e IgM apresentaram resultados médios de respectivamente 10.078,0; 413,8 e 625,0 mg/dL e que ao se multiplicar esses valores pelo volume recomendado de colostro a ser ingerido pelo bezerro recém-nascido (em torno de quatro litros), este receberia taxas de cerca de 403 g de IgG, de 16,5 g de IgA e de 25g de IgE que chegariam íntegras ao intestino, pois a atividade da protease do suco abomasal ainda é pequena neste período de vida imediato ao nascimento (TIZARD, 2008).

Essas imunoglobulinas no intestino conferem, imunidade local ao neonato, principalmente a IgG, que protege o bezerro de várias doenças causadas por vírus e bactérias, por sua função de participar do processo de destruição de patógenos (QUIGLEY, 2004; TIZARD, 2008). A IgA, por sua vez, confere a imunidade das mucosas, sendo útil apenas enquanto o recém-nascido estiver recebendo colostro (TIZARD, 2008).

A presença de imunoglobulinas colostrais no organismo do bezerro recém-nascido pode ter efeitos imuno-regulatórios resultando em baixas de linfócitos B próprios do bezerro e de produção de imunoglobulina endógena nos linfonodos mesentéricos, fatores que podem interferir na precoce imunização ativa (vacinação) do neonato (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998).

Diversos autores avaliaram a influência da administração de colostro suplementado com imunoglobulinas a bezerros recém-nascidos, e seus resultados positivos com a melhoria da resposta imune dos mesmos (ARTHINGTON et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; HAMMER et al., 2004; BERGE et al., 2009; PARREÑO et al., 2010).

2.2.2 Leucócitos

O colostro contém por volta de 1×10^6 a 3×10^6 leucócitos/mL, sendo a maioria deles viáveis, e com maiores valores percentuais para macrófagos (40-50%) e menores para linfócitos (22-25%) (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Gomes (2008) ao estudar os componentes imunológicos do colostro bovino, além de maior quantidade de células encontrou a predominância celular de macrófagos/ células epiteliais, seguidos numericamente por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no colostro de primeira e de segunda ordenha, destacando ainda que os polimorfonucleares neutrófilos aumentaram seus números na segunda ordenha. De acordo com resultados também obtidos por este pesquisador ao se fornecer o volume ideal de colostro, equivalente a 10% do peso vivo do bezerro (em torno de quatro litros) em suas primeiras 12 horas p.n., se forneceria em torno de 35 milhões de células a esse recém-nascido.

A transferência dessas células leucocitárias colostrais e a passagem delas para o sistema orgânico dos bezerros já foram comprovadas por vários pesquisadores (RIEDEL-CASPARI, 1993; REBER et al., 2006; 2008a, b; NECHVATALOVA et al., 2011), ao passo que sua influência sobre o sistema imune do recém-nascido ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se, no entanto que os leucócitos colostrais aumentam a atividade dos linfócitos dos neonatos que o recebem (REBER et al., 2008b), desenvolvem atividade bactericida no intestino (RIEDEL-CASPARI, 1993), e produzem citocinas (BARRINGTON; PARISH, 2001; HAGIWARA; ANDO, 2008), além de poderem permanecer na circulação neonatal em torno de três a cinco semanas após a ingestão do colostro (CORTESE, 2009).

Visando elucidar o papel dos leucócitos colostrais na imunidade neonatal, alguns pesquisadores têm estudado os efeitos do oferecimento do colostro com e sem células para recém-nascidos. Com esse intuito, em 1993, Riedel-Caspari, comparou os resultados da mamada de colostro rico em células e de colostro sem células, fornecidos respectivamente a dois grupos de dez bezerros recém-nascidos, infectados experimentalmente com *Escherichia coli* enteropatogênica (ECEP) após três horas de nascimento. O grupo que recebeu “pool” de colostro rico em células eliminou menos *E.coli* pelas fezes, além de apresentar maiores concentrações de IgM e IgA, que agem contra este tipo bacteriano quando comparado com os animais que mamaram colostro livre de células. Evidenciou-se a capacidade bactericida das células colostrais na circulação do recém-nascido, bem como a ação dos linfócitos, recebidos via colostro sobre o aumento das imunoglobulinas específicas para esta linhagem bacteriana.

Reber et al. (2008a) estudaram por meio da citometria de fluxo, o papel do colostro rico em células sobre a proliferação de monócitos do bovino recém-nascido. Para tal utilizaram dois grupos de bezerros, um que recebeu colostro rico em células e outro que recebeu colostro livre de células. Verificaram que o grupo tratado com o colostro livre de células apresentou maiores números de monócitos nas primeiras 48 horas, além de apresentar maiores teores de moléculas de adesão, caracterizados como sendo: CD11a, CD11b, CD11c e CD14. O comportamento possivelmente resultou da necessidade do aumento do número de monócitos e de moléculas de adesão no sangue do grupo que recebeu colostro livre de células refletindo ação compensatória decorrente da imaturidade dessa linhagem celular. Em contraposição o grupo que ingeriu o colostro rico em células apresentou maior expressão de CD25,

envolvido na maturação dos monócitos, demonstrando ainda, aumento da capacidade de reconhecimento de antígenos via MHC de classe I.

Em continuação ao estudo sobre a interferência das células colostrais na imunidade do bezerro recém-nascido, Reber et al. (2008b), avaliaram os linfócitos em grupos de neonatos que receberam colostro rico ou livre de células. Observaram que os bezerros do grupo alimentado com colostro livre de células possuía mais linfócitos expressando CD11a, uma molécula que atua na mobilização de leucócitos e que essa expressão aumentada pode ser indicativa de inflamação sistêmica ou doença que ainda não demonstrou sintomas, sugerindo que bezerros privados de células leucocitárias colostrais estejam mais propensos ao estresse ambiental e a infecção por patógenos ambientais. Por sua vez, o grupo de bezerros que recebeu colostro rico em células apresentou porcentagens maiores de linfócitos expressando marcadores de ativação CD25 e CD26, por até sete dias p.n., além de maior expressão de MHC de classe I. Estes resultados sugerem que o grupo que recebeu colostro com células apresenta uma maturação e ativação mais precoce dos linfócitos.

Ao avaliar a transferência via colostro de imunidade humoral e mediada por células em leitões, Nechvatalova et al. (2011), verificaram a transferência da imunidade celular à prole via ingestão de colostro, ao demonstrarem a presença de linfócitos maternos em linfonodos mesentéricos e no sangue periférico de leitões. Evidenciaram também, por meio de estimulação *in vitro*, que os linfócitos encontrados nos leitões foram capazes de reconhecer um antígeno utilizado para imunizar as mães.

Os trabalhos anteriormente descritos demonstraram que além da comprovação da transferência de leucócitos via ingestão de colostro pelos recém-nascidos, estes leucócitos desempenham um importante papel no desenvolvimento de sua imunidade.

Pelas conclusões obtidas em seus trabalhos, Reber et al. (2006) sugerem que o papel das células leucocitárias colostrais seja o de disseminar e promover a resposta adaptativa no bezerro recém-nascido.

2.2.3 Citocinas

Citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, reguladoras da resposta imune e sintetizadas frente a ações inflamatórias e/ou antigênicas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; TIZARD, 2008; BANNERMAN, 2009). Estão presentes em sua forma biologicamente ativa no colostro de fêmeas bovinas (SORDILLO et al., 1991; YAMANAKA et al., 2003a, b; MADUREIRA, 2011).

Deve ainda ser destacado que a origem das citocinas do colostro ainda não está completamente aclarada, questionando-se se são produzidas pelos leucócitos presentes no colostro ou secretadas pelos tecidos da glândula mamária (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

A transferência dessas proteínas via colostro aos recém-nascidos de diversas espécies foi relatada por diversos autores (GOTO et al., 1997; OKADA et al., 1997; HAGIWARA et al., 2000; HAGIWARA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2001; MUNETA et al., 2004; OHTSUKA et al., 2006; MADUREIRA, 2011; SECOR; MATYCHAK; FELIPPE, 2012), em particular citocinas como o TNF- α , a IL-6, a IL-1 β e o IFN- γ já tiveram sua transferência comprovada do colostro bovino para bezerros recém-nascidos (GOTO et al., 1997; HAGIWARA, 2000; YAMANAKA, 2003; MADUREIRA, 2011). Demonstrando-se segundo autores (CHASE; HURLEY; REBER, 2008) que as mesmas possuem um papel no recrutamento de linfócitos para o intestino dos bezerros e que colaboram no desenvolvimento da imunidade dos mesmos.

2.2.3.1 Citocinas avaliadas

Neste trabalho as citocinas estudadas foram o TNF- α , a IL-1 β , a IL-6 e o IFN- γ , pois são citocinas com presença comprovada no colostro e parecem estar envolvidas com a mobilização de linfócitos para o intestino e com o desenvolvimento do sistema imune adequado do recém-nascido (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). São citocinas que possuem um padrão Th1, isto é, são indutoras principalmente da expressão de respostas imunes celulares e atividades pró-inflamatórias (PAUL;

SEDER, 1994; ODBILEG et al., 2005), que incluem a ativação de macrófagos, os aumentos da síntese de proteínas de fase aguda e da imunidade celular (BURTON et al., 2009). Neste sub-tópico será abordado de forma sucinta o papel de cada uma das citocinas avaliadas nesta pesquisa sobre a imunidade.

2.2.3.1.1 *Interleucina -1 beta (IL-1 β)*

A IL-1 β é a mais potente citocina indutora de febre, sendo sua principal fonte o fagócito mononuclear ativado. Podem ser sintetizada por células T, células B, células NK, células de *Langerhans* e do endotélio vascular, queratinócitos, e fibroblastos (DINARELLO, 1989; TIZARD, 2008). Sua produção é induzida em resposta a estímulos inflamatórios, sejam estes produzidos por vírus ou por outras citocinas como o IFN- γ e o TNF- α (DINARELLO, 1989).

Quando secretada em baixa quantidade, atua como mediadora da inflamação local e em maiores quantidades, como mediador endócrino na corrente sanguínea, compartilhando os mesmos efeitos sistêmicos da citocina TNF (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A IL-1 β também estimula células CD4+ a secretarem IL-2, bem como proliferação e ativação de células B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, com isso aumentando as atividades fagocitárias e a estimulação dos hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda (DINARELLO, 1989).

A suplementação oral em bezerros recém-nascidos com IL-1 β , no primeiro dia de vida, provocou um aumento das populações de neutrófilos e linfócitos do sangue após doze horas de sua ingestão (HAGIWARA et al., 2001).

2.2.3.1.2 *Interleucina-6 (IL-6)*

A IL-6 está envolvida na mediação da imunidade inata e adaptativa, é indutora de febre, atua na diferenciação de células B, no aumento da resposta pró-inflamatória dos neutrófilos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BANNERMAN, 2009) e na

diferenciação das células T, é um cofator na síntese de IgM e IgA juntamente com a IL-1 e IL-5, respectivamente (TIZARD, 2008).

Possui efeito pleiotrópico com propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo expressada por uma gama de diferentes células, representadas por: linfócitos, macrófagos, monócitos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos. Responde ainda, a estímulos de vírus e bactérias (BANNERMAN, 2009).

A IL- 6 induz os hepatócitos a produzirem proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio, que auxilia a resposta inflamatória de fase aguda, colaborando também como um fator de crescimento para as células B ativadas, como coestimulador de células T e como cofator no crescimento precoce de células hematopoiéticas da medula óssea, juntamente com outras citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Burton et al. (2009) pesquisando concentrações de IL-6 no soro de potros recém-nascidos saudáveis e com septicemia observaram que não havia concentrações detectáveis no soro dos potros antes da ingestão de colostro. E que os potros saudáveis apresentaram concentrações maiores de citocina IL-6 em todos os tempos mensurados, quando comparados com as concentrações do soro dos potros com septicemia. Apesar de contraditório, tendo em vista que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que é expressada frente a infecções por vírus ou bactérias, a septicemia em potros recém-nascidos é decorrente da falha de transferência de imunidade passiva, então os teores de citocina IL-6 encontrados nos soros de potros saudáveis seriam provenientes apenas do colostro.

2.2.3.1.3 *Fator de Necrose tumoral- alfa (TNF- α)*

É uma citocina mediadora tanto da imunidade inata quanto da específica (adaptativa), atuando principalmente em resposta às infecções por bactérias Gram negativas. Produzida em grande parte pelo fagócito mononuclear ativado por lipopolissacarídeos (LPS), bem como por células NK e mastócitos ativados (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Destaca-se como efeitos sistêmicos do TNF- α : a febre e síntese de proteína de fase aguda, e que localmente, promove a ativação endotelial e mobilização de leucócitos para o local da infecção (BANNERMAN, 2009). Possui efeito sinérgico

com outras citocinas, como a IL-1, a IL-6, o M-CSF e o GM-CSF, com o aumento de macrófagos, sendo outra característica do TNF- α a promoção ou desencadeamento da apoptose em algumas células tumorais (TIZARD, 2008).

Secor, Matychak e Felipe (2012), ao pesquisarem a transferência do TNF- α em potros via colostro, observaram que 15 dos 16 potros incluídos no experimento apresentaram valores séricos antes da mamada do colostro abaixo da curva do teste de ELISA para TNF- α e a partir de dois dias após a mamada do colostro apresentaram um aumento com um máximo de 499×10^4 pg/mL, sugerindo assim que o TNF- α teria um papel na imunidade inicial dos potros recém-nascidos, devido a suas propriedades pró-inflamatórias potentes, ajudando a combater infecções comuns aos recém-nascidos dessa espécie.

2.2.3.1.4 Interferon gama (IFN- γ)

Interferon-gama ou interferon do tipo II é uma citocina que atua sobre a imunidade inata e adquirida, sendo produzida por células NK, TCD4+ e CD8+ após ativação pelas NK e por células da linhagem monocítica (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Na imunidade inata o IFN- γ possui mais efeitos sobre macrófagos e neutrófilos, aumentando a atividade microbicida e os receptores de fagocitose, induzindo assim a explosão respiratória e liberação da produção de óxido nítrico. Atua também na regulação do MHC de classe I, na apresentação de antígenos ao MHC de classe II, além de ativar células TCD4+ (BANNERMAN, 2009).

Possui ainda, atividade antiviral, induz células Th1 a produzirem IL-2 e IL-2R, e nas células Th2, atua inibindo a produção de IL-4 (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

2.2.3.2 Citocinas do colostro e seu papel na imunidade do recém-nascido

Poucos são os trabalhos publicados versando sobre a influência das citocinas do colostro no sistema imune de bezerros recém-nascidos, e assim sendo, neste sub-tópico serão descritos os estudos relacionados à possível atividade das

citocinas sobre o sistema imune de bezerros recém-nascidos e aqueles realizados *in vitro* ou em animais de laboratório, visando desvendar o papel imunitário das citocinas do colostro.

Goto et al. (1997) procuraram avaliar a transferência de IL-1 β para bezerros holandeses recém-nascidos pela ingestão de colostro. Para isso, mensuraram essa citocina na secreção da glândula mamária de fêmeas bovinas gestantes, 20 dias antes do parto e 14 dias após o parto. Nos bezerros foram colhidas amostras de sangue nos tempo 0 (ao nascimento), 3, 7 e 14 dias após o nascimento. A citocina IL-1 β foi quantificada pelo método de ELISA, em amostras de soro sanguíneo dos bezerros e no colostro e leite das vacas. A citocina foi encontrada no colostro em maior concentração dois dias antes do parto e no dia do parto, diminuindo seus teores nos tempos seguintes até sete a nove semanas depois do parto. No soro dos bezerros recém-nascidos os teores de citocina IL-1 beta obtiveram valores máximos aos três dias p.n., decrescendo até as duas semanas p.n. quando passaram a ser indetectáveis. Ainda neste estudo, Goto et al. (1997) compararam a ingestão de dois tipos de colostro: colostro que continha IL-1 β e colostro que não a continha. Verificaram que somente bezerros que foram alimentados com o colostro que possuía altas concentrações da citocina a apresentaram na circulação sanguínea, demonstrando assim, a passagem via colostro da citocina IL-1 β para o sangue dos bezerros recém-nascidos.

Procurando avaliar os efeitos imunomoduladores da administração oral de IL-1 beta em bezerros recém-nascidos, Hagiwara et al. (2001) administraram por via oral 100ng de IL-1beta bovina purificada a três bezerros recém-nascidos privados de colostro. Duas horas após a ingestão os bezerros apresentaram valores máximos da citocina no sangue. Os autores observaram um notável acréscimo nos números de leucócitos totais pós-ingestão da IL-1 β bovina purificada. Os neutrófilos tiveram um aumento 12 horas após a ingestão da IL-1 β , sugerindo a sua migração leucocitária da medula óssea para a circulação periférica, essa migração manteve-se até às 48 horas, mesmo após o desaparecimento da citocina no sangue periférico. As células das linhagens leucocitárias dos bezerros foram estimuladas com Concanavalina A (Con. A) e com Lipopolissacarídeo (LPS), havendo apenas proliferação daquelas estimuladas com o mitógeno Con. A. sugerindo que a ingestão de IL-1 β tem efeito sobre as populações de linfócitos T, mas não sobre as populações de linfócitos B.

Estes resultados demonstraram a capacidade imunoestimulatória da citocina IL-1 beta administrada oralmente.

Com o intuito de pesquisar a transferência de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ pelo colostro, Yamanaka et al., em 2003, distribuíram bezerros recém-nascidos por três grupos: primeiro grupo-que recebeu colostro de suas mães; um segundo grupo que recebeu um “pool” de colostro e um terceiro grupo, (controle)-que não recebeu colostro. Foram observadas altas concentrações das citocinas no colostro bovino e a transferência ao neonato por meio da ingestão do colostro foi comprovada, uma vez que 12 horas após a mamada as citocinas estavam presentes no soro dos bezerros, permanecendo circulantes até quatro semanas de vida. A atividade mitogênica dos leucócitos dos bezerros que receberam colostro, quando estimulados com Con. A, foi significativamente maior que aquela constatada nos bezerros privados do colostro, evidenciando que as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α ingeridas via colostro ativam as células imunes, resultando na mobilização e ativação de neutrófilos e linfócitos no sangue periférico dos recém-nascidos

Procurando observar a resposta de células mononucleares periféricas de bezerros recém-nascidos suplementados oralmente com IFN- α , Ohtsuka et al. (2006), forneceram a sete bezerros 0,1 g/dia de IFN- α durante os seus cinco primeiros dias de vida, enquanto que outros sete bezerros não a receberam e serviram de grupo controle. Colheitas de sangue periférico foram realizadas antes da suplementação com IFN- α e com uma, duas, quatro, oito e 16 semanas após o nascimento.

A suplementação oral com IFN- α em bezerros induziu uma resposta do tipo Th1, com regulação positiva da expressão de IFN- γ e regulação negativa da expressão de IL-4, houve aumentos da expressão do MHC de classe II, do número total de monócitos, que atingiram seus valores máximos às quatro semanas p.n.. Houve também aumento de linfócitos T e de teores citocinas como a IL-12 na primeira semana de vida (OHTSUKA et al., 2006).

Estes estudos evidenciam que as citocinas presentes no colostro, quando ingeridas chegam intactas ao intestino e ao serem absorvidas são capazes de produzir efeitos imunomodulatórios nos bezerros. Representam um componente imunológico importante para o bezerro recém-nascido auxiliando o desenvolvimento

da resposta imune celular (GOTO et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001; YAMANAKA et al., 2003; OHTSUKA et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstram a produção dessas citocinas pelas células do colostro que são absorvidas. Assim sendo, Madureira (2011) ao estimular *in vitro* células mononucleares colostrais com *Eschericia coli* enterotoxigênica (ECET) verificou que estas foram capazes de produzir citocinas TNF- α , IFN- γ , IL1- β e IL-6, demonstrando tendências de aumento aos 120 minutos de cultivo.

Uchida et al. (2012) demonstraram que o colostro tardio (leite de transição) pôde modular a atividade dos linfócitos na imunidade sistêmica e local e conferir proteção contra a influenza A (H1N1), em camundongos que receberam deste colostro por via oral. O colostro utilizado foi desnatado, aquecido a 72°C por 16 segundos e seco por pulverização. Esse estudo utilizou testes *in vitro* e *in vivo*. Para o estudo *in vitro*, foram usadas células de placas de Peyer do intestino de ratos, cultivadas em RPMI 1640 adicionados 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, penicilina, estreptomicina e Con A. Foram adicionadas nos diferentes grupos: 0, 0,1 ou 1,0 mg/mL do colostro previamente tratado como descrito anteriormente. Após três dias foram recolhidas amostras dos grupos e armazenadas em freezer – 80° C até o momento da mensuração. Analisaram os teores de IL-12 e IFN- γ , verificando-se que a concentração dessas citocinas foi maior nas células que receberam maior concentração do colostro (1,0mg/mL).

No estudo *in vivo*, os animais foram distribuídos por três grupos que receberam por via oral: solução salina estéril (grupo controle); 400 μ g/g do colostro em pó dissolvido em solução salina estéril, e 2000 μ g/g do colostro em pó também dissolvido em solução salina estéril. Os animais foram infectados com o vírus da influenza A três semanas após o recebimento do colostro/ solução salina, e eutanasiados após a apresentação dos sintomas. As citocinas IL-12 e IFN- γ foram dosadas pelo método de ELISA, no soro sanguíneo não havendo diferenças estatísticas entre os grupos, quanto à citocinas IL-12 e IFN- γ . No entanto, quando mensurada a citocina IFN- γ nos pulmões, verificou-se uma maior concentração nos pulmões dos camundongos que receberam 2000 μ g/g de colostro; este grupo também apresentou menor intensidade de sintomas que os demais.

Considerando a literatura consultada, a produção de citocinas pelas células do colostro também foi evidenciada, considerando-se que essas células são absorvidas ainda viáveis e podem atuar no organismo do recém-nascido,

contribuindo com o desenvolvimento da imunidade celular. Contudo, esta mesma literatura disponível não elucida todos os mecanismos envolvidos na transferência, produção e função das citocinas no sistema imune dos recém-nascidos.

2.3 MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DOS COMPONENTES IMUNOLÓGICOS MATERNOS

O mecanismo de absorção das imunoglobulinas colostrais é conhecido. Em neonatos, a atividade proteolítica abomasal é pequena e é ainda mais reduzida pela presença de tripsina no colostro. Assim, as proteínas do colostro podem chegar integras até o intestino (TIZARD, 2008). No intestino ocorre a absorção das imunoglobulinas com o auxílio do receptor FcRn, que se liga às imunoglobulinas sendo estas englobadas por micropinocitose. Essa capacidade de absorção é maior nas primeiras horas pós-nascimento ao passo que cerca de 6 horas p.n. essa atividade já está reduzida a 50%, cessando em torno de 24-36 horas p.n. (BESSER; GAY, 1994; BARRINGTON; PARISH, 2001; TIZARD, 2008).

O mecanismo da absorção de células do colostro via intestinal, ainda não é totalmente esclarecido, mas sua absorção é comprovada (RIEDEL-CASPARI, 1993; REBER et al., 2006; 2008a,b; TIZARD, 2008; NECHVATALOVA et al., 2011). Em leitões, os linfócitos presentes no colostro são transportados nos espaços intracelulares do intestino e levados pela circulação linfática até os linfonodos mesentéricos, isso ocorre apenas para linfócitos intactos, uma vez que células tratadas termicamente, e, portanto inativadas não foram transferidas (TUBOLY, 1988). Em bezerros recém-nascidos observaram-se evidências da absorção de leucócitos colostrais, via intestino, mais especificamente no epitélio folicular das placas de Peyer e também sua passagem para a circulação (LIEBLER-TENÓRIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002).

No caso da absorção das citocinas, acredita-se que se assemelhe ao mecanismo de absorção das imunoglobulinas, já que o epitélio intestinal do ruminante recém-nascido não é seletivo, englobando todas as proteínas ingeridas (HAGIWARA et al., 2001; TIZARD, 2008).

2.4 MANEJO COLOSTRAL E SUA INTERFERÊNCIA NOS TEORES DE IMUNOGLOBULINAS, LEUCÓCITOS E CITOCINAS

O manejo do colostro pode interferir na estrutura dos componentes imunitários, diminuindo ou impedindo sua absorção intestinal.

O congelamento, preparo de “pools” ou irradiação-gama podem diminuir a eficiência das células na transferência de imunidade via colostro. Processos de congelamento ou irradiação-gama do colostro provocam a inviabilização das células, mas não das imunoglobulinas ou citocinas (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998).

Gomes (2008) destacou a importância do fornecimento do colostro fresco, pois este teria em torno de 878.466 células/mL, ao passo que no colostro congelado não se encontram células viáveis.

No entanto, os outros compostos imunológicos não parecem alterar com o congelamento do colostro. Ao verificar a estabilidade das citocinas IL-10, IL-6, IL-8 e TNF- α no colostro de mulheres submetido ao congelamento a -20°C e -80°C, Ramírez-Santana et al.(2012), não observaram alterações na concentração inicial dessas citocinas em até seis meses de congelamento, no entanto quando esse período atingiu 12 meses as taxas da citocina IL-8 sofreram diminuição.

Quando se trata da mistura de colostros (“pool” de colostro), pode haver diluição dos componentes imunológicos de colostros de boa qualidade ao misturá-los com colostros de qualidade inferior (GODDEN, 2008). Sem contar que este processo é seguido de congelamento, então a diluição dos componentes imunológicos, associada ao congelamento do colostro, diminuiria sua qualidade e capacidade de conferir imunidade passiva, pela inviabilização das células.

Processos de tratamento do colostro têm sido empregados, tais como o aquecimento, visando eliminar possíveis microrganismos patogênicos. Donahue et al. (2012), concluíram que um tratamento térmico de 60°C durante 60 minutos foi capaz de minimizar a população bacteriana nas amostras de colostro, sem interferir na concentração de IgG. No entanto, este processo pode inviabilizar as células, diminuindo sua capacidade de estimular a imunidade celular do bezerro recém-nascido.

Johnson et al. (2007) procuraram avaliar as quantidades de leucócitos no sangue de bezerros tratados com “pool” de colostro cru e com “pool” de colostro

tratado a 60°C por 60 minutos, no entanto não observaram diferenças estatísticas no número de leucócitos do sangue dos recém-nascidos dos dois grupos. A explicação encontrada por esses autores é que nenhum dos bezerros dos dois grupos absorveu os leucócitos presentes nos “pools” de colostro, pois os colostros fornecidos não pertenciam às suas respectivas mães e estes reconheceriam os leucócitos colostrais como “non-self”.

Elizondo-Salazar e Heinrichs (2009) avaliaram a influência do tratamento térmico do colostro nos linfócitos do sangue de bezerros recém-nascidos e também não encontraram diferenças significativas no número de linfócitos entre os grupos alimentados com colostro cru e com colostro tratado termicamente.

Stieler, Bernardo e Donovan (2012) conduziram um estudo para avaliar a função dos neutrófilos e monócitos em bezerros recém-nascidos alimentados com colostro fresco ou com aquele que havia sido armazenado congelado. As populações de neutrófilos e monócitos do sangue dos bezerros foram analisadas por citometria de fluxo, nos dias 2 e 21 após receberem a alimentação com colostro fresco ou com colostro congelado, sendo estimuladas com *Echerichia coli* por duas horas. Os resultados obtidos mostraram uma maior ativação dos neutrófilos que receberam colostro congelado, contrariando a hipótese de que colostro livre de células teria um papel menor na maturação do sistema imune, porém, tal fato pode ser explicado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias com o rompimento das células colostrais após o congelamento e descongelamento do colostro. As alterações dos monócitos não foram significativas estatisticamente.

Para analisarem os efeitos do congelamento prolongado e da pasteurização do leite humano, Akinbi et al. (2010), estudaram a concentração e a atividade de IgA, lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase após o congelamento ou pasteurização, constatando que a pasteurização do leite diminuiu a concentração desses componentes, assim como sua atividade imunológica, e em menor grau, após o congelamento também houve um decréscimo na concentração desses componentes e de suas atividades.

Ainda em estudos realizados com leite humano, Ewaschuk et al. (2011), buscaram avaliar o comportamento de compostos do leite, entre eles, as citocinas presentes, após congelamento e pasteurização. Para isso fizeram um “pool” de leites congelados e descongelados a 37°C antes da pasteurização provenientes de quatro mulheres, sendo a seguir este “pool” congelado a -80°C. Verificaram que

após a pasteurização a 62,5°C durante 30 min. houve um decréscimo acentuado na concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IFN- γ e TNF- α .

A literatura consultada apresenta resultados controversos em relação à diminuição dos componentes imunológicos do colostro/leite frente aos processos utilizados para sua conservação. No entanto, esses processos para obtenção de “pool” de colostro, congelamento e tratamento com aquecimento do colostro, apesar de contribuírem para o manejo prático no dia-a-dia da propriedade leiteira, parecem alterar a qualidade da transferência de imunidade passiva aos bezerros, pela possível destruição de alguns de seus componentes imunitários.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi realizado visando à avaliação da transferência das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α presentes no colostro para o sangue dos bezerros neonatos, sendo que para isso foram constituídos três grupos experimentais, após o nascimento, conforme descrito a seguir:

Grupo 1 (G1): (n=5)- os bezerros deste grupo receberam quatro litros de colostro fresco, provenientes de suas próprias mães e fornecidos nas primeiras seis horas de vida, e a seguir passaram a receber leite em volume equivalente a 10% do peso vivo/dia, divididos em duas alimentações diárias fornecidas através de mamadeira.

Grupo 2 (G2): (n=5)- os bezerros deste grupo receberam quatro litros de colostro congelado, provenientes de “pools” de colostro existentes na propriedade, fornecidos nas primeiras seis horas de vida, e passaram a receber leite em volume equivalente a 10% do peso vivo/dia, divididos em duas alimentações diárias fornecidas através de mamadeira.

Grupo 3 (G3): (n=5)- os bezerros deste grupo não receberam colostro, sendo alimentados somente com leite em volume equivalente a 10% do peso vivo/dia, divididos em duas alimentações diárias fornecidas através de mamadeira.

3.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados 15 bezerros da raça Holandesa, recém-nascidos provenientes de duas propriedades distintas, sendo que para os bezerros do grupo G1 houve a utilização de suas genitoras. Os animais do grupo G1 fizeram parte de uma pesquisa da professora Doutora Viviani Gomes, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, que

nos cedeu as amostras de soro dos bezerros e de colostro de suas mães, utilizadas neste trabalho.

Os animais alocados no grupo G1 permaneceram em sua propriedade de origem, localizada em Nova Odessa no Estado de São Paulo, distando em 124 km da capital. Os animais pertencentes aos grupos G2 e G3, nascidos em uma propriedade leiteira localizada em Araras no estado de São Paulo, (distante 189 km da capital) após seu nascimento, foram imediatamente transferidos de sua propriedade de origem, para as dependências da Faculdade de Medicina Veterinária no Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Essas duas propriedades fornecedoras dos animais foram escolhidas por terem um grande número de partos/dia e por adotarem um sistema sanitário bem definido com todas as fêmeas vacinadas periodicamente contra diarreia neonatal, mastite ambiental, ceratoconjuntivite infecciosa bovina e clostridioses e manejo semelhante, separando seus bezerros logo após o nascimento, e fornecendo colostro fresco de suas mães e contando com um banco de colostro, para garantir a colostragem dos animais.

Destaca-se que para a composição do grupo G3, foram adquiridos ao todo 12 (doze) bezerros, pois durante a execução do experimento, alguns desses animais (n=7) apresentaram enfermidades, a saber: diarreias (n=5) e afecções respiratórias (n=2), sendo estes retirados do experimento para serem tratados.

3.3 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais utilizados no experimento nasceram todos de parto eutócico, provenientes de vacas e novilhas sadias, foram selecionados por meio de exame físico como proposto por Dirksen (1993), excluindo-se os animais que apresentaram qualquer alteração orgânica.

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

3.4 ADEQUAÇÃO DAS INSTALAÇÕES

Escolheu-se utilizar as dependências da Faculdade de Medicina Veterinária no Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, devido à existência de instalações com maior espaço físico e também pela sua localização estratégica, na cidade de Pirassununga que dista apenas 45 km da propriedade leiteira no município de Araras, Fazenda da qual os bezerros dos grupos G2 e G3 foram adquiridos.

No caso dos animais do grupo que mamou colostro de suas próprias mães, (grupo 1), optou-se por mantê-los em sua propriedade de origem, no município de Nova Odessa, onde ficaram aos cuidados da equipe da Professora Doutora Viviani Gomes.

As baias que alojaram os animais foram desinfetadas previamente à entrada de cada lote de animais e diariamente durante o período experimental.

Os animais foram abrigados em baias diferentes de acordo com seu grupo, no máximo em número de dois animais/baia. As roupas utilizadas para o manejo dos bezerros eram de uso exclusivo, para tal finalidade, sendo as botas higienizadas em pedilúvio com cal antes de cada entrada nas baias. As mamadeiras eram individualizadas para cada grupo experimental, sendo submetidas à lavagem com detergente a cada uso e depois permaneciam em molho de água quente.

3.5 ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Os bezerros foram alimentados inicialmente (até doze horas pós-nascimento-p. n.) conforme o grupo experimental a que pertenciam (colostro da própria mãe, “pool” de colostro ou leite), a saber:

Grupo 1 - G1 – Grupo composto por cinco (n=5) bezerros que receberam quatro litros de colostro fresco, provenientes de suas mães,

Grupo 2 - G2 – Grupo composto por cinco (n=5) bezerros que receberam quatro litros de colostro congelado, aquecido em banho-maria a 37°C no momento

do fornecimento provenientes de “pool” de colostro existente na propriedade de origem.

Grupo 3 - G3 – Grupo composto por cinco (n=5) bezerros que não receberam colostro, sendo alimentados somente com leite.

A seguir os animais dos grupos foram alimentados com leite em volume complementar ao equivalente a 10% do seu peso vivo, em suas primeiras 24 horas pós nascimento. A partir do segundo dia a alimentação era fornecida via mamadeira, em volume equivalente a 10% do peso vivo do animal (Figura 1), dividido em duas refeições diárias, também era disponibilizado “ad libitum” água e ração, para estímulo do desenvolvimento dos pré-estômagos.

Figura 1 - Alimentação via mamadeira

Fonte: (SHECAIRA, C. L., 2011).

3.6 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue dos bezerros foram obtidas de acordo com os tempos programados, por meio de punção da veia jugular, utilizando-se tubo siliconizado

com vácuo, sem anticoagulante com o uso de agulha para múltiplas colheitas (25 mm X 8 mm) do sistema Vacutainer[®], para posterior determinação das citocinas presentes no soro. Os tempos determinados para as colheitas das amostras de sangue foram os seguintes:

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

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

Tempo 2 (T2): colheita realizada com 3 a 4 dias;

Tempo 3 (T3): colheita realizada com 5 a 6 dias;

Tempo 4 (T4): colheita realizada com 10 a 15 dias.

3.7 OBTENÇÃO DAS ALIQUOTAS DE SORO SANGUÍNEO

As amostras de soro foram obtidas após sinérese do sangue e centrifugação a 730G por 20 minutos em centrífuga comum, sendo armazenadas em freezer a – 80°C, localizado no laboratório de Pesquisa do Departamento de Reprodução Animal, em duas alíquotas de 2 mL, acondicionadas em microtubos.

3.8 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE COLOSTRO DAS FÊMEAS HOLANDESAS E DO “POOL” DE COLOSTRO.

Foram coletadas das fêmeas fornecedoras de colostro para os bezerros do grupo G1, duas alíquotas de colostro antes da primeira ordenha após a higienização da glândula mamaria e tetos, retirando as sujidades a seco, e posteriormente imergindo os tetos, um a um em solução de hipoclorito de sódio e secando-os individualmente com papel toalha. A primeira alíquota foi reservada ao exame microbiológico, portanto mais uma limpeza dos tetos foi realizada, friccionando um chumaço de algodão embebido em álcool 70% no teto, dando ênfase para seu orifício, a seguir, um frasco estéril foi aberto, e colocado com a inclinação de 90° em relação ao teto, onde permaneceu aberto por no máximo cinco segundos para evitar

contaminação ambiental, fechando-se o frasco assim que a amostra foi colhida, seguindo as recomendações do National Mastitis Council (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981).

Para a determinação das citocinas, uma segunda alíquota de 10 mL foi colhida em tubos cônicos, com capacidade para 15 mL, para o transporte dessas alíquotas de colostro, as mesmas foram imersas em gelo moído, acondicionadas em caixa térmica.

Coletou-se amostras de colostro para a realização do exame microbiológico dos colostros utilizados para compor o “pool” fornecido ao grupo de bezerros do G2, essas amostras foram colhidas em frasco estéril, permanecendo o frasco aberto por no máximo cinco segundos, de acordo com recomendações do National Mastitis Council (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981). A segunda alíquota destinada à determinação das taxas de citocinas foi obtida após a mistura de todos os colostros, e depois de seu congelamento e descongelamento. Foi acondicionada em frasco estéril tipo Falcon com capacidade para 15 mL, preenchendo apenas 10 mL de sua capacidade e armazenadas em freezer – 80°C.

3.9 OBTENÇÃO DAS ALIQUOTAS DO SOBRENADANTE DO COLOSTRO

Para a obtenção de alíquotas do sobrenadante do colostro, o mesmo foi centrifugado a fim de separar a gordura dos demais componentes. Foi necessária a realização de alguns testes com diferentes velocidades, tempos e quantidades de colostro para realizar essa separação com sucesso. O êxito foi alcançado alíquotando-se 1,0 mL de cada amostra de colostro, acondicionando em microtubos (capacidade de 1,5 mL) e centrifugando-os em centrífuga própria, com velocidade de 6.000G, refrigerada a 4°C, durante 30 minutos (TÉCNICA PADRONIZADA POR MEDICI, 2011). Após a centrifugação, desprezou-se a gordura separada pela centrifugação, pipetando-se o sobrenadante do colostro e acondicionando-os em frascos crio resistentes, para posterior congelamento em freezer – 80°C, onde permaneceram até o momento da mensuração das citocinas. Este procedimento foi realizado tanto para as amostras individuais de colostro, como para a amostra de “pool” de colostro.

3.10 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO COLOSTRO

Para a verificação da qualidade do colostro realizou-se um teste microbiológico, semeando o colostro em placas de petri com ágar sangue de ovino (ágar base com 7% de sangue ovino), a 37°C, durante 72 horas, após essa etapa realizou-se o teste bacteriocópico, pelo método de Gram.

3.11 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS

Após o término da etapa de colheita de soro sanguíneo dos bezerros de todos os grupos experimentais, as amostras de soro foram acondicionadas sem descongelar em um reservatório com gelo seco para garantir a preservação da baixa temperatura e posteriormente encaminhadas para a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

No laboratório de pesquisa do Departamento de Clínica Médica as amostras foram novamente acondicionadas em freezer -80°C até o momento da mensuração das taxas das citocinas. A quantificação das citocinas foi realizada no Laboratório de Imunologia do referido Departamento, utilizando-se de kits comerciais, pelo método de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). Um método específico e altamente sensível para quantificar citocinas presentes em diversas soluções.

Houve dificuldades na obtenção dos kits para a espécie bovina, portanto utilizou-se um kit para a espécie humana, baseando-se na homologia de constituição das mesmas citocinas em diferentes espécies, que ocorre quando a sequência de aminoácidos da citocina da segunda espécie tem pelo menos 60% de identidade com os aminoácidos da citocina da primeira espécie, tal fato é comprovado em 47 tipos de citocinas, tais como as analisadas nesta pesquisa (SCHEERLINCK, 1999). Mesmo decidindo utilizar kits comerciais para ELISA de uso humano, houve dificuldades na obtenção dos mesmos, em virtude de trâmites de importação e por não haver o produto em estoque no momento da importação, em virtude dessas intercorrências, a citocina Interferon-gama não foi dosada no sobrenadante do

colostro das fêmeas fornecedoras de colostro ao grupo G1 (Amostras fornecidas pela Professora Doutora Viviani Gomes).

Os kits utilizados foram: Human IL-1beta ELISA Set II; Human IL-6 ELISA Set, Human TNF-alfa ELISA Set e Human-IFN-gama Set, adquirido da empresa BD Biosciences® – San Diego, CA, USA (Figura 2).

Dosaram-se as citocinas IL-1beta, IL-6, IFN-gama e TNF-alfa no soro dos bezerros, no sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas e no sobrenadante do “pool” de colostro, nas alíquotas de sobrenadante do colostro foram dosadas apenas as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Para isso em um primeiro momento placas de poliestireno com 96 micropoços (Nunc®) foram incubadas “over night”, a 37°C, em câmara úmida com anticorpos de captura em cada micropoço de acordo com a citocina a ser quantificada. No dia seguinte as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem contida no kit em lavadora automática (Clean Up, Microplate Washer, ALKA Technologies, São Paulo, Brasil), posteriormente foram pipetados 100 μ L da solução padrão em 16 micropoços, o restante dos micropoços da placa foram depositados 100 μ L de soro sanguíneo ou colostro em duplicata. A placa foi incubada por duas horas em temperatura ambiente.

Após a incubação, a placa foi lavada com solução de lavagem em lavadora automática descrita acima por cinco vezes. 100 μ L de anticorpo de detecção foram adicionados em cada micropoço e a placa incubada por mais uma hora em câmara escura, a seguir lavou-se a placa novamente por mais sete vezes e adicionou uma solução de bloqueio (50 μ L em cada poço). A placa foi lida em 450nm de absorbância em leitor de ELISA modelo ELX-808, da marca Biotek Instruments®, Winooski, USA utilizando o software Gen5. Os resultados foram apresentados em pg/mL.

Figura 2 - Componentes do Kit comercial para ELISA, BD-Biosciences®. Juntamente com placa de poliestireno Nunc®

Fonte: (SHECAIRA, C. L., 2012).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores encontrados estão apresentados sob a forma de média, mediana, desvio-padrão, valores máximos, valores mínimos e P-valor.

Para a análise estatística os dados obtidos da mensuração das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk Test e não apresentaram distribuição normal.

Desta maneira, escolheu-se fazer a comparação entre medianas, pois essa medida é pouco influenciada por valores que se distanciam muito dos demais valores de concentração.

Os dados foram submetidos a um teste não paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis, para averiguar a existência de pelo menos um grupo diferente dos demais. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com nível de significância com P menor que 0,05. Para os tempos que os grupos apresentaram diferença estatística realizou-se um pós-teste, denominado de comparações múltiplas para verificar entre quais grupos de bezerros houve diferença estatística, utilizando a correção de Bonferroni.

Todas as análises estatísticas realizadas foram feitas com o auxílio do programa estatístico R (FONDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2013).

5 RESULTADOS

Neste tópico foram descritos os resultados referentes à mensuração das taxas de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , no soro dos bezerros dos grupos G1(grupo que recebeu colostro fresco materno), G2 (grupo que recebeu “pool” de colostro congelado) e G3 (grupo que recebeu apenas leite em pó restituído), nos tempos: **T0**: colheita realizada no primeiro dia de vida, antes da ingestão do colostro; **T1**: colheita realizada com 1 a 2 dias de vida dos animais; **T2**: colheita realizada com 3 a 4 dias de vida dos animais; **T3**: colheita realizada com 5 a 6 dias de vida dos animais e **T4**: colheita realizada com 10 a 15 dias de vida dos animais

Também são apresentados os resultados das comparações de concentração das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante do colostro das genitoras dos bezerros do grupo G1 e no sobrenadante do “pool” de colostro fornecido aos bezerros do grupo G2.

As concentrações de cada citocina foram fornecidas em picogramas por mililitros.

5.1 CITOCINAS NO SORO DOS BEZERROS DOS GRUPOS G1, G2 E G3, AVALIADAS NOS TEMPOS T0, T1, T2, T3 E T4.

5.1.1 Interleucina-1 beta (IL-1 β)

As concentrações da citocina IL-1 β foram mensuradas no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3 nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, com o uso de kits comerciais para ELISA. Os resultados encontrados foram apresentados em forma de média, desvio-padrão, mediana, valores máximos e valores mínimos (Tabela 1).

O grupo G1 apresentou concentração mediana em todos os tempos do grupo G1: 1,265; 9,455; 11,56; 1,89 e 3,4 pg/mL respectivamente. Sendo sua maior

concentração mediana observada no tempo T2 (11,56 pg/mL), que foi também a maior concentração mediana encontrada ao se observar todos os grupos.

Ao observar-se o comportamento da citocina IL-1 β nos tempos mensurados do grupo G2 notou-se que as concentrações medianas dessa citocina foram detectáveis apenas no tempo T2 (0,01432 pg/mL).

Quanto ao grupo G3, o único tempo com concentrações medianas positivas foi o tempo T4 (0,141 pg/mL), nos demais tempos foram indetectáveis (Tabela 1 e Gráficos 1 e 2)

Tabela 1 - Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) em pg/mL nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Tempo	IL-1 beta	G1	G2	G3
T0	Máximo	2,29	0	0
	Mínimo	0,27	0	0
	Mediana	1,265 ^a	0 ^b	0 ^b
	Média	1,272	0	0
	Desvio-padrão	0,824	0	0
	Máximo	61,25	0,063	0,423
T1	Mínimo	1,12	0	0
	Mediana	9,445 ^a	0 ^b	0 ^b
	Média	20,32	0,012	0,094
	Desvio-padrão	28,22	0,028	0,185
	Máximo	12,25	0,477	0
T2	Mínimo	0,23	0	0
	Mediana	11,56 ^a	0,014 ^a	0 ^b
	Média	8,60	0,106	0
	Desvio-padrão	1,27	00,208	0
	Máximo	3,52	0,087	1,144
T3	Mínimo	0	0	0
	Mediana	1,89	0	0
	Média	1,748	0,017	0,228
	Desvio-padrão	1,272	0,039	0,511
	Máximo	7,06	1,013	0,549
T4	Mínimo	0	0	0
	Mediana	3,4 ^a	0 ^a	0,079 ^a
	Média	3,465	0,244	0,141
	Desvio-padrão	3,809	0,439	0,231

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013). a, b – valores medianos com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si

Gráfico 1 - Representação gráfica da concentração mediana da citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L.(2013).

Gráfico 2 - Representação gráfica das concentrações da citocina IL-1 β (IL-1 β),em pg/mL no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2012).

Pode-se observar diferença estatística para a citocina IL-1 β nos tempos T0, T1, entre dos grupos G1 e G2 e G1 e G3, T2 e T3 entre os grupos G1 e G2, G1 e G3. Os grupos G2 e G3 não diferiram estatisticamente entre si, bem como nenhum grupo foi diferente estatisticamente no tempo T4 (Tabela 2).

Tabela 2- Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis

Citocina	Tempo	p-valor	Diferença estatisticamente Significante
IL.1 β	T0	0.001881	Sim
	T1	0.00963	Sim
	T2	0.004042	Sim
	T3	0.031775	Sim
	T4	0.29993	Não

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

5.1.2 Interleucina -6 (IL-6)

As concentrações da citocina IL-6 foram mensuradas no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3 nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, com o uso de kits comerciais para ELISA. Os resultados encontrados foram apresentados em forma de média, desvio-padrão, mediana, valores máximos e valores mínimos (Tabela 3).

As medianas da concentração da citocina IL-6 do grupo G1 apresentaram valores maiores que 0 (zero) para todos os tempos mensurados (T0, T1, T2, T3, T4) 0,25, 0,86, 3,88, 2,12 e 1,245 pg/mL respectivamente, tendo valores máximos em T2 (3-4dias) (Tabela 3 e Gráficos 3 e 4).

O grupo G1 apresentou concentrações crescentes da IL-6 do tempo T0 até o tempo T2, nos demais intervalos de tempo T3 e T4, as concentrações apresentaram uma diminuição.

Para o grupo G2 houve apenas um tempo com concentração detectável o tempo T3 (1,245 pg/mL), enquanto que o grupo G3 não apresentou concentrações detectáveis para a interleucina-6 em nenhum dos tempos mensurados (T0, T1, T2, T3 e T4) (Tabela 4 e Gráficos 3 e 4).

Tabela 3 - Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Interleucina-6 (IL-6) em pg/mL, nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Tempo	IL-6	G1	G2	G3
T0	Máximo	0,75	3,725	0
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	0,25	0	0
	Média	0,3125	0,745	0
	Desvio-padrão	1,123	1,665	0
T1	Máximo	1,05	16,09	0
	Mínimo	0,21	0	0
	Mediana	0,86 ^a	0	0 ^b
	Média	0,742	3,476	0
	Desvio-padrão	0,344	7,073	0
T2	Máximo	4,03	11,22	0
	Mínimo	0,6	0	0
	Mediana	3,88	0	0
	Média	2,837	3,515	0
	Desvio-padrão	1,938	5,111	0
T3	Máximo	4,72	4,212	0
	Mínimo	0,06	0	0
	Mediana	2,12 ^a	1,194	0 ^b
	Média	2,518	1,612	0
	Desvio-padrão	1,875	1,817	0
T4	Máximo	2,43	0	0
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	1,245 ^a	0 ^b	0 ^b
	Média	1,23	0	0
	Desvio-padrão	1,123	0	0

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013). a, b – valores medianos com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si

Gráfico 3 - Representação gráfica da concentração mediana da citocina Interleucina – 6 (IL-6) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

Gráfico 4 - Representação gráfica das concentrações da citocina IL-6 (IL-6) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

Pode-se observar diferenças estatísticas entre os grupos G1 e G3 nos tempos T1, T3 e T4. Quando comparado os grupos G1 e G2 apresentaram diferença estatística somente no tempo T4.

Entre os grupos G2 e G3 não foi encontrada diferença estatística em nenhum dos tempos observados (Tabela 4).

Tabela 4 - Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Interleucina-6 (IL-6) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis

Citocina	Tempo	Diferença estatisticamente	
		p-valor	Significante
IL-6	T0	0.090824	Não
	T1	0.042351	Sim
	T2	0.074168	Não
	T3	0.020697	Sim
	T4	0.012825	Sim

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

5.1.3 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

As concentrações da citocina TNF- α foram mensuradas no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3 nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, com o uso de kits comerciais para ELISA. Os resultados encontrados foram apresentados em forma de média, desvio-padrão, mediana, valores máximos e valores mínimos (Tabela 5).

Quanto às concentrações medianas da citocina TNF- α , os valores medianos máximos foram atingidos em tempo T1 pelo grupo G1 (2,37 pg/mL). Após esse tempo, houve um decréscimo demonstrado em T2 (0,99 pg/mL), até que no tempo T3 os valores medianos foram indetectáveis para este grupo.

Os grupos G2 e G3 não apresentaram valores medianos detectáveis em nenhum dos tempos (T0, T1, T2, T3 e T4) (Tabela 5 e Gráficos 5 e 6).

Tabela 5 - Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Tempo	TNF-α	G1	G2	G3
T0	Máximo	0	0	2,069
	Mínimo	0	0	
	Mediana	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Média	0	0	0,413
	Desvio padrão	0	0	0,925
T1	Máximo	25,71	2,901	0
	Mínimo	0,22	0	0
	Mediana	2,37 ^a	0 ^a	0 ^b
	Média	7,602	0,580	0
	Desvio-padrão	10,774	1,297	0
T2	Máximo	35,9	11,62	0
	Mínimo	0,61	0	0
	Mediana	0,99 ^a	0	0 ^b
	Média	10,73	2,324	0
	Desvio-padrão	15,463	5,197	0
T3	Máximo	24,92	0	0
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Média	4,984	0	0
	Desvio-padrão	11,144	0	0
T4	Máximo	4,33	0	0
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Média	0,866	0	0
	Desvio-padrão	1,936	0	0

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013). a, b – valores medianos com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si

Gráfico 5 - Representação gráfica da concentração mediana da citocina Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) em pg/mL, no soro de bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

Gráfico 6 - Representação gráfica das concentrações da citocina Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

Houve diferenças estatísticas entre os grupos G1 e G3 no tempo T1 e no tempo T2. Os demais tempos não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

O grupo G2 também não apresentou diferença estatística quando comparado com os grupos G1 e G3 (Tabela 6).

Tabela 6- Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis

Citocina	Tempo	p-valor	Diferença estatisticamente Significante
TNF. α	T0	0.367879	Não
	T1	0.008038	Sim
	T2	0.00795	Sim
	T3	0.367879	Não
	T4	0.367879	Não

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

5.1.4 Interferon- γ (IFN- γ)

As concentrações da citocina IFN- γ foram mensuradas no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3 nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4, com o uso de kits comerciais para ELISA. O tempo T1 do grupo G1 não foi dosado, por problemas com o kit. Ressalta-se que serão dosados em pesquisas posteriores.

Os resultados encontrados foram apresentados em forma de média, desvio-padrão, mediana, valores máximos e valores mínimos (Tabela 7 e gráficos 7 e 8).

A concentração de IFN- γ apresentou valores medianos acima de 0 (zero) nos tempos T2(4,401 pg/mL) e T3 (10,18 pg/mL) dos bezerros do grupo G1, sendo o do T3 com o maior valor mediano encontrado. Os demais grupos G2 e G3 não demonstraram valores medianos detectáveis em qualquer um dos tempos estudados (T0, T1, T2, T3 e T4).

Tabela 7 - Valores médios, medianos, máximos e mínimos da citocina Interferon- gama (IFN- γ) em pg/mL, nos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Tempo	IFN-γ	G1	G2	G3
T0	Máximo	0	0	0
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Média	0	0	0
	Desvio-padrão	0	0	0
T1	Máximo	N	5,492	0
	Mínimo	N	0	0
	Mediana	N	0 ^a	0 ^a
	Média	N	1,495	0
	Desvio-padrão	N	2,393	0
T2	Máximo	33,28	0	2,949
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	4,401 ^a	0 ^b	0 ^a
	Média	10,08	0	0,5898
	Desvio-padrão	13,813	0	1,318
T3	Máximo	18,67	0	5,677
	Mínimo	0,725	0	0
	Mediana	10,18 ^a	0 ^b	0 ^b
	Média	10,48	0	1,135
	Desvio-padrão	7,019	0	2,538
T4	Máximo	3,221	0	0
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Média	0,805	0	0
	Desvio-padrão	1,610	0	0

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

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

N- amostras não dosadas.

Gráfico 7- Representação gráfica da concentração mediana da citocina Interferon –gama (IFN- γ) em pg/mL, no soro de bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

Gráfico 8 - Representação gráfica das concentrações da citocina Interferon-gama (IFN- γ) em pg/mL, no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

Pode-se observar diferença estatística entre os grupos G1 e G2 no tempo T2. Entre os grupos G1 e G2 no tempo T3, e entre os grupos G1 e G3 também no tempo T3 (Tabela8).

Tabela 8- Diferenças estatísticas apresentadas entre os três grupos de bezerros, G1, G2 e G3, para a citocina Inteferon-gama (IFN- γ) demonstradas pelo teste de Kruskal Wallis

Citocina	Tempo	p-valor	Diferença estatisticamente Significante
IFN- γ	T0	0.125476123	Não
	T1	0.136037128	Não
	T2	0.0022621358	Sim
	T3	0.003651098	Sim
	T4	0.286504797	Não

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

5.2 CITOCINAS NO SOBRENADANTE DO COLOSTRO DAS FÊMEAS HOLANDEAS GENITORAS DOS BEZERROS DO GRUPO G1 E DO “POOL” DE COLOSTRO

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram dosadas no sobrenadante do colostro de cada mãe fornecido aos bezerros do grupo G1 e no sobrenadante do “pool” fornecido aos bezerros do grupo G2, com o uso de kits comerciais para ELISA. Em virtude de dificuldades na importação dos kits comerciais para ELISA e disponibilidade de estoque, não foi possível dosar a concentração de IFN- γ nos sobrenadante do colostro das mães do grupo G1.

Os valores encontrados na mensuração das amostras de colostro fornecidas aos bezerros do grupo G1 e na amostra de “pool” de colostro fornecido aos bezerros do grupo G2 tiveram seus valores apresentados em mediana e P-valor para as amostras do colostro fresco, e valor absoluto e P-valor para a amostra de “pool” de colostro.

Quando comparou-se as concentrações medianas das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no colostro fornecido ao grupo G1 com as concentrações mensuradas na alíquota de “pool” de colostro não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação das concentrações medianas das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante dos colostros fornecidos ao grupo G1 com a concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 mensuradas no “pool” de colostro fornecido ao grupo G2

Citocina	Colostro	“Pool” colostro	P valor
TNF- α	5,655pg/mL	8,693pg/mL	0.294
IL-1 β	2,525pg/mL	4,698pg/mL	0.093
IL-6	2,71pg/mL	0,550pg/mL	0.406
IFN- γ	-	3, 455 pg/mL	-

Fonte: SHECAIRA, C. L. (2013).

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento adequado do sistema imune de um bovino recém-nascido determina sua sobrevivência e sua capacidade de responder a microrganismos presentes no ambiente. Este desenvolvimento se dá mais rapidamente com o fornecimento do colostro ao bezerro recém-nascido (MOREIN; ABUSUBRA; BLOMQVIST, 2002; CHASE; HULEY; REBER, 2008; TIZARD, 2008; CORTESE, 2009).

O colostro atua como um suporte imunológico muito importante. É o maior fornecedor de transferência de imunidade passiva. Sua composição além de conter nutrientes para suprir as demandas energéticas do recém-nascido, também contém fatores imunitários, que conferem imunidade passiva. Dentre os componentes imunitários, as imunoglobulinas ocuparam um lugar de destaque, tendo suas funções bem esclarecidas quanto à responsabilidade de conferir imunidade aos recém-nascidos passivamente (BENESI, 1993; MORAES et al., 1997; FEITOSA et al., 2001; SOARES FILHO et al., 2001; FEITOSA et al., 2010; HILL, 2010). Ademais, não são somente as imunoglobulinas, que constituem esses fatores imunitários presentes no colostro, mas também há leucócitos (RIEDEL-CASPARI, 1993; REBER et al., 2007; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; GOMES, 2008) e citocinas (SORDILLO et al., 1991; GOTO et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001; YAMANAKA, et al., 2003a,b; MADUREIRA, 2011).

Quanto aos leucócitos colostrais, sabe-se que essas células maternas contribuem para o rápido desenvolvimento das células apresentadoras de antígenos nos bezerros, que serão a chave para as respostas da imunidade adquirida frente a patógenos e vacinações (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Amplificando a resposta linfocitária neonatal, conferindo efeitos bactericidas no intestino, além de produzir citocinas (BARRINGTON; PARISH, 2001).

As citocinas presentes no colostro também têm seu papel no desenvolvimento do sistema imune do recém-nascido, papel que vem sendo estudado em várias espécies, não estando ainda totalmente esclarecido. Porém, estudos mostram que a ingestão de citocinas pelos bezerros via colostro produz a ativação de células

imunes, arregimentando e ativando neutrófilos e linfócitos no sangue periférico dos recém-nascidos (YAMANAKA et al., 2003b).

A respeito da transferência de citocinas aos bezerros via colostro, poucos são os artigos existentes, assim objetivou-se pesquisar a transferência de citocinas colostrais para o soro de bezerros recém-nascidos, e a possível interferência do manejo deste colostro. Este trabalho nos permitiu a quantificação da concentração das citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , no soro de bezerros alimentados com colostro de suas próprias mães (grupo G1), no soro de bezerros alimentados com “pool” de colostro (grupo G2) e no soro de bezerros alimentados apenas com leite em pó (grupo G3). Também pode-se avaliar a presença de citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α no sobrenadante de colostro proveniente das genitoras dos animais do grupo G1, e as citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ no sobrenadante do “pool” de colostro fornecido aos animais do grupo G2.

Todos os valores medianos das citocinas encontrados nos soros dos bezerros dos três grupos, no sobrenadante do colostro das genitoras do grupo G1 e o sobrenadante do “pool” de colostro foram obtidos com o uso de um Kit comercial da marca BD[®] de Ensaio Imunossorvente ligado à Enzima, (ELISA), um kit de uso humano. O que nos permitiu a utilização de um kit humano foi a porcentagem de suficiente homologia das citocinas bovinas avaliadas em relação às citocinas humanas. Como apontado por Scheerlinck (1999), quando há um mínimo de 60% de homologia no perfil de aminoácidos das citocinas de diferentes espécies (a espécie que o kit é destinado, e outra espécie utilizada) haverá possível reação cruzada das amostras com os anticorpos presentes no kit e assim o teste poderá ser realizado fornecendo um resultado válido. Todas as citocinas em questão apresentaram homologia maior que 60% com as citocinas da espécie humana (IL-1 β - 65%, IL-6- 68%, TNF- α - 77% e IFN- γ 60,8%, respectivamente).

No entanto, as concentrações de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ encontradas neste trabalho foram inferiores quando comparadas com os resultados da literatura consultada. Os trabalhos consultados também divergiram entre si quanto aos valores encontrados (GOTO et.al., 1997; HAGIWARA et.al., 2001; YAMANAKA et al., 2003b; MUNETA et al., 2007; MADUREIRA, 2011).

6.1 CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DO COLOSTRO DAS MÃES E NO “POOL” DE COLOSTRO FORNECIDO AOS BEZERROS DOS GRUPOS G1 E G2 RESPECTIVAMENTE

Para que fosse possível comprovar a transferência das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α para o sangue de bezerros recém-nascidos via ingestão de colostro, foram mensuradas as concentrações das referidas citocinas, com exceção da IFN- γ , no sobrenadante do colostro fresco das mães fornecido aos bezerros do grupo G1. Em virtude de dificuldades na obtenção dos kits comerciais utilizados, a citocina IFN- γ não pode ser quantificada no sobrenadante dos colostros fornecidos ao grupo G1. Também visando o cumprimento dos objetivos propostos, para podermos avaliar a interferência do manejo do colostro na transferência das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , mensurou-se as concentrações das citocinas no “pool” de colostro fornecido aos bezerros do grupo G2. Neste trabalho, os valores medianos das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α avaliadas nos sobrenadantes dos colostros frescos proveniente das mães dos bezerros do grupo G1 foram respectivamente: 2,7; 2,5 e 5,6 pg/mL, os valores das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ encontrados no sobrenadante do “pool” de colostro fornecido aos bezerros do grupo G2 foram respectivamente: 0,5; 4,6; 8,6 e 3,4 pg/mL. Quando confrontados estatisticamente os valores medianos do colostro e o “pool” de colostro, não houve diferença estatística. Hagiwara et al. (2000) encontraram os respectivos valores médios para as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de vacas da raça Holandesa: 8.440,2 $\pm$ 2.990,0; 770,0 $\pm$ 310,5; 9.260,5 $\pm$ 461,8 e 2.610,3 $\pm$ 59,0 pg/mL, sendo que esses valores foram encontrados com o uso de Kits de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) e neste trabalho, os pesquisadores utilizaram citocinas purificadas como imunógenos, estimulando as células colostrais a produzirem mais citocinas, destacando-se que no presente estudo, isto não foi realizado.

Procurando determinar a concentração das citocinas IFN- γ e TNF- α , pelo método de ELISA, no colostro de vacas sadias e com mastite por coliforme, Hisaeda et al. (2001), destacando-se que para a citocina IFN- γ , não foram encontrados valores detectáveis no colostro de vacas sadias, enquanto que encontraram valores de 20.000 pg/mL para a mesma citocina no colostro de vacas acometidas pela

mastite. Para a citocina TNF- α os valores encontrados foram abaixo de 1000 pg/mL para as vacas sadias e 200.000 pg/mL para vacas acometidas pela mastite.

Madureira (2011) verificou os seguintes valores medianos para as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ encontradas no sobrenadante do colostro de vacas Holandesas respectivamente: 41,5; 13,5; 57,9 e 20,8 pg/mL destaca-se que esses resultados foram obtidos pelo método de ELISA, com um kit de uso humano, tal como o utilizado na presente pesquisa.

Quando se comparou a concentração das citocinas mensuradas neste trabalho, com a literatura consultada, observou que os valores encontrados na presente pesquisa foram inferiores aos trabalhos pesquisados. As diferenças encontradas no material e métodos das literaturas consultadas podem justificar esse contraste, como por exemplo, o uso de imunógenos por Hagiwara et al. (2000) que estimula a secreção das citocinas, assim como diferenças no número de animais avaliados também podem ter influenciado este resultado. Neste estudo foi utilizado o colostro de cinco fêmeas bovinas Holandesas para cada grupo (colostro e “pool” de colostro), enquanto que Madureira (2011) mensurou as citocinas no colostro de 22 fêmeas bovinas Holandesas. Além dos fatores como o manejo ambiental, vacinações, exposição antigênica e histórico do animal avaliado, que influenciam a produção de citocinas e as próprias características das citocinas, como vida curta, pleiotropia, receptores múltiplos que podem esclarecer a variabilidade nos resultados encontrados.

6.2 CITOCINAS PRESENTES DO SORO SANGUÍNEO DOS BEZERROS DOS GRUPOS G1, G2 e G3.

Como proposto nos objetivos desta dissertação as concentrações das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 foram mensuradas no soro dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4 que abrangeram os primeiros quinze dias de vida p.n. desses neonatos. Destacam-se os raros trabalhos versando sobre as concentrações dessas citocinas no soro de bezerros recém-nascidos e quando são comparados os dados obtidos no presente trabalho com aqueles da

literatura disponível (GOTO et al., 1997; YAMANAKA et al., 2003b; MADUREIRA, 2011) as concentrações medianas obtidas das citocinas mensuradas foram inferiores as concentrações obtidas em trabalhos semelhantes descritos por Goto et al. (1997) e Yamanaka et al. (2003b). Além de que, não foram encontrados trabalhos específicos para bezerros recém-nascidos que demonstrassem a interferência do manejo do colostro e do não fornecimento de colostro na transferência de citocinas.

Goto et al. (1997) ao mensurarem a interleucina 1β no soro de bezerros recém-nascidos, puderam observar taxas máximas dessa citocina no terceiro dia após o nascimento e recebimento de colostro (1.000 pg/mL), após este momento, houve um decréscimo, passando-se a ser indetectável aos 14 dias.

Yamanaka et al. (2003b) mensuraram as mesmas citocinas avaliadas neste trabalho, ou seja: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL- 1β , além do receptor agonista da IL-1, no momento do nascimento, às 12 horas após o nascimento, com um dia p.n., três dias p.n., cinco dias p.n. sete dias p.n. 14 dias p.n., 21 dias p.n. e 28 dias p.n.. Os valores máximos encontrados por esses autores para as citocinas IL-6, IL- 1β , IFN- γ e TNF- α , foram respectivamente, de 1.023pg/mL; 46.900 pg/mL; 190 pg/mL e 690 pg/mL, verificados no tempo correspondente a 24 horas pós-ingestão do colostro, havendo clara relação da constatação com a ingestão de colostro.

Madureira em 2011 mensurou a concentração das citocinas TNF- α , IL-6, IL- 1β nos soro de bezerros recém-nascidos que receberam colostro de suas mães em quatro momentos pós-nascimento. Estas citocinas não apresentaram valores detectáveis no tempo zero, antes do fornecimento de colostro e nos tempos seguintes de 24, 72, 96 horas p.n. as concentrações de citocinas foram detectáveis, alcançando seus valores medianos mais altos em 72 horas após a ingestão do colostro: 4,29pg/mL (IL- 1β), 3,80 pg/mL (IL-6) e 6,20 pg/mL (TNF- α). Passando a serem indetectáveis aos 15 dias pós-nascimento.

Enquanto que nesta pesquisa, os bezerros alimentados com colostro fresco provenientes de suas próprias mães (grupo G1) apresentaram respectivamente os seguintes valores medianos máximos para as citocinas IL- 1β , IL-6, TNF- α e IFN- γ : 11,56; 3,88; 2,37 e 10,1 8 pg/mL.

Tal contraste de concentrações obtidas pode ser resultado da diferença entre os kits comerciais para ELISA empregados, e que neste trabalho como já citado anteriormente era um kit de uso humano. Madureira (2011), no entanto, utilizou-se

do mesmo kit comercial para ELISA tendo obtido os resultados anteriormente descritos. Representando o único trabalho no qual as concentrações medianas das citocinas avaliadas se aproximaram dos obtidos nesta pesquisa. Por sua vez, Goto et al. (1997) utilizaram um kit para ELISA próprio para a espécie bovina, com uma maior sensibilidade por ser kit específico para a espécie animal, portanto deve ser a provável razão de ter obtido concentrações com maior magnitude do que as encontradas neste trabalho.

A interleucina IL-1 β apresentou valores medianos de 1,265 pg/mL, no tempo T0, tempo correspondente ao primeiro momento após o nascimento e antes da ingestão de colostro. No trabalho conduzido por Goto et al. (1997) também encontraram concentrações pequenas de IL-1 β , antes da mamada do colostro. Apesar da condição hipo-agamaglobulinêmica dos bezerros em decorrência da conformação da placenta, esta baixa concentração de citocinas IL-1 β sugere que pode ter havido passagem de pequenas concentrações das citocinas via placenta (GOTO et al., 1997).

A interleucina-1 β e a interleucina-6 tiveram suas maiores taxas demonstradas no tempo T2 (3 a 4 dias p.n.) 11, 56pg/mL e 3,88 pg/mL respectivamente, resultados esses que se assemelharam àqueles encontrados por Goto et al. (1997) para a citocina IL-1 β e por Madureira em 2011, para estas mesmas citocinas. A citocina TNF-alfa teve sua maior concentração no tempo T1 (1 a 2 dias) 2,37pg/mL, resultado semelhante ao encontrado por Yamanaka et al. (2003b). Diferentemente das demais citocinas avaliadas, a citocina IFN- γ , apresentou seu pico mais tardiamente, aos 5 a 6 dias (10,08pg/mL), correspondente ao momento T3, tendo este resultado discordância com aqueles encontrados na literatura (YAMANAKA et al., 2003b; MADUREIRA, 2011). Entende-se que parte da concentração das citocinas avaliadas no soro dos bezerros do grupo G1, incluiria além daquela parcela absorvida pela ingestão de colostro, uma outra que teria sido produzida por células colostrais absorvidas pelo trato intestinal, considerando-se que estas células ficam circulantes durante três a cinco semanas no organismo do bezerro (CORTESE, 2009).

Zaitseva et al. (1995) demonstraram que populações de linfócitos T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ humanos, desafiados com *Brucella abortus* inativados, produziram grandes quantidades de citocina IFN- γ , no período compreendido entre os cinco a sete dias

após o desafio realizado *in vitro*. Este resultado, encontrado por Zaitseva et al. (1995), corrobora com a hipótese de que o Interferon- γ tenha sido produzido por linfócitos provenientes do colostro absorvidos via intestinal, pois o IFN- γ teve seu valores máximos encontrados no soro do grupo G1 aos 5 a 6 dias de vida, tendo em vista que os outros grupos avaliados nos quais essas células não estavam presentes não expressaram valores detectáveis dessa citocina.

Animais que compuseram o grupo G2 não tiveram valores medianos detectáveis com exceção do tempo T3 (5 a 6 dias) para a concentração de IL-6 (1,194 pg/mL). No entanto, todas as citocinas mensuradas na amostra do “pool” de colostro fornecido aos animais do grupo G2 possuíam concentrações detectáveis, porém, não foi possível a demonstração dessa transferência, após a ingestão do “pool” de colostro pelos bezerros nos momentos avaliados, para as citocinas IL-1 β , IFN- γ e TNF- α . Deve-se destacar que esse fato ocorreu apesar de quando comparadas as medianas das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 presentes no colostro fornecido aos bezerros do grupo G1, com aquelas das mesmas citocinas mensuradas no “pool” de colostro fornecido aos bezerros do grupo G2, não terem sido observadas diferenças estatísticas, constatando-se ainda que os bezerros do grupo G1 demonstraram maiores as concentrações séricas para todas as citocinas. Considerando o manejo do “pool” de colostro, talvez possamos buscar fatores que elucidam este comportamento.

O “pool” de colostro foi congelado em freezer -20°C, após a mistura de todos os colostros que o compuseram. Quando consultado em literatura as possíveis alterações do colostro decorrentes do congelamento, pode-se verificar diferentes respostas para as citocinas e células do colostro frente a esse tipo de conservação. Estudos realizados por Ramírez-Santana et al. (2012) demonstraram que citocinas colostrais humanas permaneceram com a mesma concentração inicial mesmo após terem sido mantidas sob congelamento a -20°C e -80°C por seis meses. No entanto, as células colostrais sofreriam lise e, portanto inviabilização funcional após o processo de congelamento e descongelamento (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998; GOMES, 2008). Gomes, em 2008, encontrou 878.466 células/mL no colostro de primeira ordenha de fêmeas bovinas Holandesas, sendo estas representadas em sua maioria por macrófagos e células epiteliais, seguidas numericamente por linfócitos e neutrófilos. É reconhecido que os macrófagos possuem alta capacidade

de produção das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ (TIZARD, 2008; BANNERMAN, 2009). Demonstrando indiretamente que os leucócitos presentes no colostro fresco, absorvidos via epitélio intestinal (placas de Peyer) (LIEBLER-TENÓRIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002) são capazes de produzir citocinas (BARRINGTON; PARISH, 2001) no período que se encontram circulantes no sangue dos bezerros, cerca de três a cinco semanas pós-ingestão do colostro no sangue de bezerros (CORTESE, 2009).

O aquecimento do “pool” de colostro em banho-maria a 37°C para o fornecimento aos bezerros do grupo G2 pode ter interferido na concentração final das citocinas avaliadas. Ressalta-se que a mensuração das citocinas no “pool” de colostro foi realizada utilizando-se uma alíquota retirada logo após a mistura dos colostros, sendo posteriormente congelada a – 80°C até o momento da realização do teste de ELISA, destacando-se que não foram aliquotadas amostras deste “pool” de colostro após o aquecimento em banho-maria a 37°C o que não permite a comprovação da hipótese de um efeito decorrente do aquecimento. Não foram encontrados trabalhos descrevendo a possível influencia desse tipo de tratamento em colostro bovino, entretanto, Ewaschuk et al. (2011) analisaram o comportamento das taxas de citocinas IL-1 β , IFN- γ e TNF- α após congelamento, aquecimento e pasteurização de um “pool” de leite humano. Verificaram que após a pasteurização a 62,5°C durante 30 minutos ocorreu um decréscimo acentuado na concentração dessas citocinas. A elucidação da diferença entre as transferências de citocinas via colostro fresco materno e “pool” de colostro para os bezerros do grupo G1 e G2, respectivamente, parece estar vinculada ao manejo que o “pool” de colostro recebeu, resultando em diminuição da qualidade imunológica dos colostros que o compunham, pela lise das células leucocitárias, seja pela possível perda de citocinas. Ressalta-se a necessidade de que frente os conhecimentos atuais dos componentes imunológicos do colostro mais trabalhos sejam realizados determinando a concentração de citocinas no colostro após o congelamento e aquecimento em banho-maria, pois são práticas corriqueiras usadas no manejo e conservação do colostro. Em relação ao manejo do colostro em fazendas leiteiras, deve-se privilegiar o fornecimento do colostro fresco aos bezerros recém-nascidos, na impossibilidade de tal manejo, observar rigorosamente e cuidar para que o aquecimento do colostro não ultrapasse a temperatura de 37°C, para evitar a suposta volatilização ou destruição das citocinas.

O grupo G3, que não recebeu colostro, mamando apenas leite em pó reconstituído durante os quinze dias p.n., não apresentou concentrações detectáveis das citocinas avaliadas em nenhum dos momentos mensurados, com exceção da citocina IL-1 β , no tempo T4 (10 a 15 dias), quando apresentou o valor mediano de 0,07pg/mL. Como já citado anteriormente, esses animais não receberam colostro, sendo, portanto esta concentração de citocina IL-1 β no tempo T4, provavelmente produzida pelo sistema imune do próprio bezerro, que neste período de vida (10 a 15 dias p.n.) tendo em vista não ter recebido a imunidade passiva colostrar começa a desenvolver uma imunidade ativa mais precocemente (BORGES, 1997) com equilíbrio entre as respostas Th1/Th2, com o início de desenvolvimento de sua resposta imune celular (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Quando comparada as concentrações medianas obtidas neste trabalho para as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6, no soro sanguíneo dos bezerros dos grupos G1, G2 e G3, pode-se notar diferença no comportamento dessas concentrações ao longo dos momentos observados (T0, T1, T2, T3 e T4) na primeira quinzena de vida. Os animais do grupo G1 apresentaram concentrações medianas maiores que aquelas dos animais dos demais grupos em todos os tempos avaliados. Salienta-se ainda, que a produção de citocina é um evento breve, não havendo seu armazenamento após a produção (ABBAS; LICHTMAN, 2005) e que o bezerro neonato nos primeiros dias após o nascimento apresenta deficiência na resposta do tipo Th1, em decorrência dos hormônios liberados durante o parto, fator que compromete a resposta imune celular, que é aquela responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias como é o caso das citocinas avaliadas neste estudo (MOREIN; ABUSUBRA; BLOMQVIST, 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Pode-se concluir que a concentração maior das referidas citocinas nos tempos mensurados no grupo G1 em relação àquelas do grupo G2 está relacionada provavelmente com a presença de células no colostro fresco, e a sua capacidade de produzir citocinas (BARRINGTON; PARISH, 2001), fato que não ocorre no “pool” de colostro submetido ao congelamento e aquecimento em banho-maria (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998; GOMES, 2008).

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo concluiu-se que:

- a) houve transferência de citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ para os bezerros do grupo G1 por meio da ingestão de colostro fresco materno;
- b) houve transferência somente da citocina IL-6, para os bezerros do grupo G2, por meio da ingestão de “pool” de colostro;
- c) bezerros recém-nascidos privados de colostro (G3) não apresentaram concentrações detectáveis de citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ nos primeiros quinze dias de vida, comprovando-se que as concentrações detectáveis dessas citocinas nesse período de vida nos demais grupos (G1 e G2) provieram do colostro e
- d) O grupo de bezerros que recebeu colostro de suas próprias mães (G1) obteve maior concentração de citocinas que o grupo que recebeu “pool” de colostro (G2), demonstrando que além das quantidades destas naturalmente presentes no colostro fresco, pode haver nesses teores a participação das células leucocitárias preservadas capazes de expressar citocinas no sangue periférico de bezerros recém-nascidos até 15 dias pós-nascimento.

REFERÊNCIAS

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

AKINBI, H.; MEINZEN-DERR, J.; AUER, C.; MA, Y.; PULLUM, D.; KUZANO, R.; RESZKA, K. J.; ZIMMERLY, K. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, p. 347-352, 2010.

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.

ARTHINGTON, J. D.; CATTELL, M. B.; QUIGLEY, J. D.; MCCOY, G. C.; HURLEY, W. L. Passive immunoglobulin transfer in newborn calves fed colostrum or spray-dried serum protein alone or as a supplement to colostrum of varying quality. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2834–2838, 2000.

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

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

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

BERGE, A. C. B.; BESSER, T. E.; MOORE, D. A.; SISCHO, W. M. Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 286–295, 2009.

BESSER, T. E.; GAY, C. C. The importance of colostrum to the health of the neonate calf. In: KASARI, T. R.; WIKSE, S. E. **The clinics of north America: food animal practice**. Philadelphia: [s.n.] 1994. p.107-115.

BORGES, A. S. **Avaliação da eficácia da administração de plasma por via intravenosa, como tratamento da falência de transferência de imunidade passiva em bezerros da raça Holandesa.** 1997. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; São Paulo, 1997.

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

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

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

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1989.

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

DONAHUE ,M.; GODDEN, S.; BEY, R.; WELLS, S.; OAKES, J. M.; SREEVATSAN, S.; STABEL, J.; FETROW, J. Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms decreases colostrum microbial counts while maintaining colostrum immunoglobulin G concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 95 p. 2697–2702, 2012.

ELIZONDO-SALAZAR, J. A.; HEINRICHS, A. J. Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy heifers: effects on growth characteristics and blood parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 92 p. 3265–3273, 2009.

EWASCHUK, J. B.; UNGER, S.; O'CONNOR, D. L.; STONE, D.; HARVEY, S.; CLANDININ, M. T.; FIELD, C. J. Effect of pasteurization selected immunecomponents of donated human breast milk. **Journal of Perinatology**, v. 31, p. 593-598, 2011.

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.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; BOVINO, F.; LISBOA, J. A. N.; PERRI, S. H. V.; GASPARELLI, E. R. F. Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p.696-704, 2010.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics Food Animal and Practice**, v. 24, p.19–39, 2008.

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

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

HAMMER, C. J.; QUIGLEY, J. D.; RIBEIRO, L.; TYLER H. D. Characterization of a colostrum replacer and a colostrum supplement containing IgG concentrate and growth factors. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 106–111, 2004.

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

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

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

HILL, J. A. G. **Transferência de imunidade passiva colostrar em bezerras neonatas da Região Metropolitana de Curitiba, Palmeira e Carambeí, Estado do Paraná e suas interrelações**. 2010 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

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

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

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIEDEL-CASPARI, G.; POHLENZ, J. F. Uptake of colostrar leucocytes in the intestinal tract of newborns calves. **Veterinary Immunology and Histopathology**, v. 85, p. 33-40, 2002.

JOHNSON, J. L.; GODDEN, S. M.; MOLITOR, T.; AMES, T.; HAGMAN, D. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5189–5198, 2007.

MADUREIRA, K. M. **Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva**. 2011. 85 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

MENANTEAU-HORTA, A. M.; AMES, T. R.; JOHNSON, D. W.; MEISKE, J. C. Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea vaccines. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v. 49, p.10-14, 1985.

MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M.; TOBIAS, F. L. Evolução da imunidade passiva em fêmeas bovinas da raça holandesa. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 435-440, 1997.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Histopathology**, v. 87 p. 207-213, 2002.

MUNETTA, Y.; YOSHIHARA, K.; MINAGAWA, Y.; NAGATA, R.; MORI, Y., YAMAGUCHI, T.; TAKEHARA, K. Bovine IL-18 ELISA: Detection of IL-18 in sera of pregnant cow and newborn calf and in colostrum. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 26, p. 203-213, 2005.

NECHVATALOVA, K.; KUDLACKOVA, H.; LEVA, L.; BABICKOVA, K.; FALDYNA, M. Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.142, p. 95–100, 2011.

NONNECKE, B. J.; WATERS, W. R.; GOFF, J. P.; FOOTE, M. R. Adaptive immunity in the colostrum-deprived calf: Response to early vaccination with Mycobacterium bovis strain bacille Calmette Guérin and ovalbumin. **Journal of Dairy Science**, v. 95 p. 221–239, 2012.

ODBILEG, R.; LEE, S. L.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Cloning and sequence analysis of llama (lama glama)Th2 (LI-4, LI-10 and LI- 13) cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 145-153, 2005.

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

OKADA, H.; ITO, T.; OHTSUKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H.; YAMASHITA, K.; YOSHINO, T.; ROSOL, T. J. Detection of Interleukin-1 and Interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells *in vitro*. The **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 7, p. 503-507, 1997.

PARREÑO, V.; MARCOPPIDO, G.; VEGA, C.; GARAICOECHEA, L.; RODRIGUEZ, D.; SAIF, L.; FERNÁNDEZ, F. Milk supplemented with immune colostrum: Protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p.12–27, 2010.

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76, p. 241-251, 1994.

PERINO, L. J.; RUPP, G. P. Immunization of the beef cow and its influence on fetal and neonatal calf health. In: **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia: [s.n.], 1994. p.15-35.

QUIGLEY, J. D.; STROHBEHN, R. E.; KOST, C. J.; O'BRIEN, M. M. Formulation of colostrum supplements, colostrum replacers and acquisition of passive immunity in neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2059–2065, 2001.

FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHICLIFF, K. W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

RAMÍREZ-SANTANA, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; AUDÍ, C.; CASTELL, M.; MORETONES, M. G.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; CASTELLOTE, C.; FRANCH, A. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2319–2325, 2012.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system I. Effects on monocyte lineage cells **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p.186–196, 2008a.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 305–313, 2008 b.

REBER, A. J.; LOCKWOOD, A.; HIPPEN, A. R.; HURLEY, D. J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p.139–150, 2006.

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

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.

SALMON, H.; BERRI, M.; GERDTS, V.; MEURENS, F. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 384–393, 2009.

SECOR, E. J.; MATYCHAK, M. B.; FELIPPE, M. J. B. Transfer of tumor necrosis factor- α via colostrum to foals. **Veterinary Record**, v. 51, p.1-5, 2012.
Doi:10.1136/vr.100220. Disponível em < <http://www.veterinaryrecord.bmj.com>>
Acessado em: 12 Jul. 2013.

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

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

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.

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

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

STIELER, A.; BERNARDO, B. S.; DONOVAN G. A. Neutrophil and monocyte function in neonatal dairy calves fed fresh or frozen colostrum. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 10, n. 4, p. 328-334, 2012.

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

TUBOLY, S.; BERNATH, S.; GLAVITS, R.; MEDVECZKY, I. Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 20, p. 75-85, 1988.

UCHIDA, M. S. K.; HIRUTA, B. S. N.; YAMAGUCHI, B. S. H.; YAMASHITA, M. S. K.; FUJIMURA, B. S. K.; YASUI, P. D. Augmentation of cellular immunity and protection against influenza virus infection by bovine late colostrum in mice. **Nutrition**, v. 28, p. 442–446, 2012.

URUAKPA, F. O.; ISMOND, M. A. H.; AKOBUNDU, E. N. T. Colostrum and its benefits: a review. **Nutrition Research**, v. 22, p. 755-767, 2002.

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

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

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

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

WATTIAUX, M. A. Raising dairy heifers. **Wisconsin: the babcock institute for international dairy research and development**, 1996. 125 p.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VANMETRE, D. C.; HOSTETLER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 569–577, 2000.

WYATT, C. R.; BRACKETT, E. J.; PERRYMAN, L. E.; DAVIS, W. C. Identification of $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets that populate calf ileal mucosa after birth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, p. 91-103, 1996.