ELISA COUTO WEISS

Avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu com até 60 dias de vida suplementados com Vitamina E injetável

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

Orientador:
Prof. Dr. Fernando José Benesi

De acordo: _____
Prof. Dr. Fernando José Benesi

São Paulo
2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3548
FMVZ

Weiss, Elisa Couto

Avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu com até 60 dias de vida suplementados com vitamina E injetável. / Elisa Couto Weiss. – 2017.
128 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Bezerros Wagyu. 2. Imunidade. 3. Função de neutrófilos. 4. Vitamina E.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu com até 60 dias de vida suplementados com Vitamina E", protocolada sob o CEUA nº 4083150217, sob a responsabilidade de **Fernando José Benesi e equipe**; **Elisa Couto Weiss** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/03/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the neutrophil function of Wagyu calves up to 60 days old supplemented with injectable Vitamin E", utilizing 26 Bovines (males and females), protocol number CEUA 4083150217, under the responsibility of **Fernando José Benesi and team**; **Elisa Couto Weiss** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/17/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2017** a **06/2017** Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **2 a 60 dias** N: **26**

Linhagem: **Wagyu** Peso: **25 a 80 kg**

Resumo: O setor agropecuário representa aproximadamente 50% das exportações totais do País segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, isso significa que os produtos do agronegócio garantem saldo comercial significativo ao País, e a pecuária de corte está entre as principais atividades que garantem a geração de capital nacional. A produção de carnes bovinas nobres também é considerada uma atividade importante para geração de renda dos produtores rurais, um exemplo disto é a criação de bovinos da raça Wagyu, uma raça originária do Japão e que é conhecida mundialmente como uma das carnes de maior valor comercial, devido ao seu sabor e marmoreio diferenciado. A criação desta raça de bovinos no Brasil é relativamente recente e o manejo para a criação destes animais em nosso país, tem sido adaptado às diferentes condições de cada região, de acordo com clima, disponibilidade de alimento, tipo de solo, entre outros. Uma das dificuldades da criação de Wagyu brasileira é a adaptação dos bezerros ao manejo local. Diversas afecções que atingem os bezerros na fase neonatal, tem sido relatadas pelos criadores da raça Wagyu no Brasil, entre elas estão diarreia, broncopneumonia e tristeza parasitária bovina, doenças que podem estar associadas à imunidade destes animais. Pesquisadores japoneses têm estudado a utilização de Vitamina E injetável, na melhora da imunidade dos bezerros Wagyu, sendo esta imunidade avaliada de diversas formas, com diferentes técnicas. Portanto sugere-se para este trabalho uma técnica ainda não utilizada nas pesquisas com bezerros Wagyu, a avaliação da função de neutrófilos, através da Citometria de Fluxo, a partir de uma amostra de sangue do bezerro. Nesta técnica seria possível avaliar a imunidade dos animais, em resposta a aplicação intramuscular de Vitamina E e também, se essa vitamina pode ser utilizada para diminuir as afecções encontradas nos rebanhos, afim de amenizar as perdas econômicas geradas pelas mesmas.

Local do experimento: Fazenda de gado de corte do estado de São Paulo

São Paulo, 15 de maio de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: WEISS, Elisa Couto

Título: Avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu com até 60 dias de vida suplementados com Vitamina E injetável.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos de cada dia e por se mostrar presente em todos os momentos, nas pequenas e nas grandes coisas, nos guiando e iluminando sempre.

Agradeço a minha família, por todo o apoio, carinho e amor incondicional que sempre me fortalecem e me enchem de esperança.

Ao meu noivo Raphael, por todo o amor, apoio e pelos conselhos que me ajudam nos desafios diários.

Ao meu orientador, Professor Fernando José Benesi, pela confiança no meu trabalho, pelas oportunidades, pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos, sempre presentes em minha vida e que não mediram esforços para me ajudar a conquistar cada etapa deste trabalho: Izabelle, Caroline, Pedro Rubens, Deisiane, Adriano, Marcos, Raquel, Karine, Eric, Carolina e Juliana.

Ao Tio Chico (Milton), por todo o auxílio na orientação do meu trabalho, pela paciência em me ensinar sobre citometria de fluxo e esclarecer minhas intermináveis dúvidas.

Ao Dr. Eliel e Dr. Rogério, pela parceria entre o campo e a nossa pesquisa. Também ao Sr. Ivair e Vítor por toda a ajuda durante as colheitas de material e contenção dos animais.

A Professora Cristina Massoco, Nicole, ao Professor Eduardo Harry Birgel Jr. e a Dra. Daniela Birguel, por toda a assistência no laboratório.

Aos animais, que são o verdadeiro motivo da escolha da minha profissão. Aos bezerros que participaram do experimento e que assim como suas mães, demonstraram docilidade impressionante. Ao cão “Caramelo”, que participou de todas as colheitas, auxiliando no deslocamento do rebanho e acima de tudo, divertindo-se com o nosso trabalho.

Agradeço a todos que colaboraram de diferentes formas com a execução deste trabalho.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é
com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

RESUMO

WEISS, E.C. Avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu com até 60 dias de vida suplementados com Vitamina E injetável.

[Evaluation of the neutrophil function of Wagyu calves during the first 60 days of life supplemented with injectable Vitamin E]. 2017. 128 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Uma das principais causas de prejuízos econômicos da pecuária mundial, é a mortalidade de bezerros nos primeiros meses de vida, devido ao desenvolvimento de afecções, pois a defesa contra estas, depende principalmente da imunidade destes animais. Nesta fase, os animais possuem seu sistema imune ainda não completamente funcional, além disso, o número de bezerros acometidos e a gravidade das doenças, pode variar de acordo com a raça dos bovinos. A literatura relata que os bezerros da raça japonesa Wagyu podem ser mais susceptíveis às afecções durante o período neonatal, quando comparados à bezerros da raça Holandesa. Porém, a maior susceptibilidade destes animais ainda não possui as razões totalmente elucidadas. Devido às consequências da menor competência imunológica dos bezerros japoneses, o desenvolvimento de estratégias para a melhoria da imunidade destes animais, vem sendo alvo de pesquisas e a utilização de antioxidantes, como a Vitamina E, é uma das tentativas para melhorar a imunidade desses neonatos. No presente trabalho, foram selecionados 26 bezerros da raça Wagyu, com média de 7,35 ($\pm 2,64$) dias de vida, os quais foram distribuídos por dois grupos de 13 animais (Grupo Controle e Grupo Vitamina E). O Grupo Vitamina E recebeu uma aplicação de Vitamina E, por via intramuscular (30 UI/kg). O Grupo Controle recebeu uma aplicação intramuscular de solução de NaCl 0,9% no mesmo volume correspondente ao de Vitamina E, de acordo com o peso do animal. Os animais foram avaliados semanalmente, durante os primeiros 60 dias de vida, por meio de exame físico, hemograma, bioquímica sérica e avaliação da função de neutrófilos com uso da citometria de fluxo. Não houve diferença entre os grupos controle e Vitamina E em nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados de exames físicos, hemograma e bioquímica sérica dos bezerros Wagyu, apresentaram comportamento semelhante ao

descrito na literatura, bem como, a maioria dos aspectos avaliados na função dos neutrófilos. A aplicação de Vitamina E na dosagem de 30UI/kg não gerou alteração na função dos neutrófilos, a partir da avaliação da produção de espécies reativas de Oxigênio (EROs) pelos granulócitos, estimulados ou não pela fagocitose de *Staphylococcus aureus* conjugado com Iodeto de propídeo (SaPI). Existe a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas, a respeito de dosagens de Vitamina E capazes de gerar alterações na função de neutrófilos dos bezerros Wagyu, afim de melhorar o perfil imunológico destes animais.

Palavras chave: Bezerros Wagyu. Imunidade. Função de neutrófilos. Vitamina E.

ABSTRACT

WEISS, E.C. **Evaluation of the neutrophil function of Wagyu calves during the first 60 days of life supplemented with injectable Vitamin E** [Avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu, com até 60 dias de vida, suplementados com Vitamina E injetável]. 2017. 128 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

One of the main causes of economic losses of livestock worldwide, is the mortality of calves in the first months of life, on account of diseases, because the immunity of these animals is a very important for their defense. At this stage, the animals have their immune system not yet fully developed, in addition, the number of calves affected and the severity of the diseases, can vary according to the breed of the cattle. The literature reports that Japanese Wagyu calves may be more susceptible to conditions during the neonatal period, in comparison to Holstein calves. However, the higher susceptibility of these animals doesn't fully elucidated. Due to the consequences of the lower immunological competence of Japanese calves, the development of strategies to improve the immunity of these animals, has been the subject of research and the use of antioxidants, such as Vitamin E, is one of the attempts to improve immunity of calves. In the present study, 26 Wagyu calves were selected, with 7.35 ($\pm$ 2.64) days of life an average, and were subdivided into two groups of 13 animals (Control Group and Vitamin E Group). The Vitamin E Group received a intramuscularly application of Vitamin E (30 IU / kg). The Control Group received an intramuscular application of 0.9% NaCl solution in the same volume corresponding to that of Vitamin E, according to the weight of the animal. The animals were evaluated weekly during the first 60 days of life, by physical examination, blood count, serum biochemistry and evaluation of neutrophil function using flow cytometry. There was no difference between the Control and Vitamin E groups in any of the evaluated parameters. The results of physical exams, hemogram and serum biochemistry of Wagyu calves, presented a behavior similar to that described in the literature, as well as, most aspects evaluated in neutrophyl function. The application of Vitamin E at 30IU/kg did not change the neutrophil function, based on the evaluation of Reative Oxygen Species (ROS)

production by granulocytes, stimulated or not by *Staphylococcus aureus* conjugated with propidium iodide (SaPI) phagocytosis. There is a need for the development of new research on Vitamin E dosages capable of generating alterations in the neutrophil function of Wagyu calves, for improve the immunological profile of these animals.

Key words: Wagyu calves. Immunity. Neutrophils functions. Vitamin E.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Molécula de α -tocoferol.....	37
Figura 2 -	Bezerros da raça Wagyu, selecionados para o experimento.....	49
Figura 3 -	Citograma demonstrando a seleção da população de granulócitos (gate) em meio aos leucócitos, de acordo com o tamanho (detectado em FSC) e com a complexidade celular (detectada em SSC).....	58
Figura 4 -	Dot plot demonstrando a divisão dos granulócitos em quatro subpopulações Q1, Q2, Q3 e Q4, de acordo com a análise de FL1 e FL3.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Idade média dos animais em cada momento de avaliação (de M1 à M8).....	50
Tabela 2 -	Valores de Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) do Ganho de peso dos animais em quilogramas (kg), dos grupos Vitamina E e Controle em cada momento.....	64
Tabela 3 -	Valores de Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) do Ganho de peso de todos animais em quilogramas (kg), em cada momento.....	64
Tabela 4 -	Valores dos componentes do Eritrograma dos animais dos grupos Controle (Cont) n=13 e Vitamina E (Vit E) n=13, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Hemácias, ADE (ou RDW) e Plaquetas, e Média e Desvio padrão (DP) para os demais parâmetros.....	66
Tabela 5 -	Valores dos componentes do Eritrograma de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Hemácias, ADE (ou RDW) e Plaquetas e Média e Desvio padrão (DP) para os demais parâmetros.....	67
Tabela 6 -	Valores medianos e Intervalo interquartil (IIQ) dos componentes do Leucograma dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8).....	71
Tabela 7 -	Valores medianos e Intervalo interquartil (IIQ) dos componentes do Leucograma de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8)	72
Tabela 8 -	Resultado dos exames bioquímicos dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Fibrinogênio, Albumina e Gama glutamiltransferase (GGT) e Média e Desvio Padrão (DP) para os demais parâmetros.....	75
Tabela 9 -	Resultado dos exames bioquímicos de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Fibrinogênio, Albumina e Gama glutamiltransferase (GGT) e Média e Desvio Padrão (DP) para os demais parâmetros.....	76
Tabela 10 -	Resultado da avaliação da função de neutrófilos, com e sem estímulo SaPI, dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), em Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros.....	81
Tabela 11 -	Resultado da avaliação da função de neutrófilos, com e sem estímulo SaPI, de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo em Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros.....	82

Tabela 12 -	Resultado da avaliação das porcentagens (%) de granulócitos, nas quatro subpopulações (Q1, Q2, Q3 e Q4) classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), em Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros.....	92
Tabela 13 -	Resultado da avaliação das porcentagens (%) de granulócitos, nas quatro subpopulações (Q1, Q2, Q3 e Q4) classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, de todos os animais, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros.....	93
Tabela 14 -	Resultado da avaliação da intensidade de produção de EROS e da intensidade de fagocitose, nas três subpopulações de granulócitos (Q1, Q2 e Q4), classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período do estudo (de M1 à M8), sendo Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros.....	94
Tabela 15 -	Resultado da avaliação da intensidade de produção de EROS e da intensidade de fagocitose, nas três subpopulações de granulócitos (Q1, Q2 e Q4), classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, de todos os animais (n=26), ao longo do período do estudo (de M1 à M8), sendo Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros.....	95
Tabela 16 -	Resultado dos exames físicos dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo Média e DP para Frequência cardíaca e Mediana e IIQ para os demais dos parâmetros estudados.....	127
Tabela 17 -	Resultado dos exames físicos de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo Média e DP para Frequência cardíaca e Mediana e IIQ para os demais dos parâmetros avaliados.....	128

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROs (EROs+), sem estímulo	84
Gráfico 2 -	Variações de mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROs (EROs+) sem estímulo, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	84
Gráfico 3 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs, entre as células EROs(+) sem estímulo.....	85
Gráfico 4 -	Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs basal das células EROS(+) sem estímulo, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	86
Gráfico 5 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de granulócitos com produção de EROs (EROs(+)), após estímulo pela fagocitose de SaPI	87
Gráfico 6 -	Mediana e IIQ das porcentagens das porcentagens de granulócitos (%) com produção de EROs (EROs+), após estímulo pela fagocitose de SaPI, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8)	87
Gráfico 7 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de avaliação (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs, entre os granulócitos EROS(+) após estímulo pela fagocitose de SaPI.....	89
Gráfico 8 -	Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs dos granulócitos EROS(+), após estímulo pela fagocitose de SaPI, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8)	89
Gráfico 9 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de granulócitos na subpopulação Q1 [EROs(-) e SaPI(+)]	96
Gráfico 10 -	Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROS (EROS+) na subpopulação Q1 [EROS(-) e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	97
Gráfico 11 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de fagocitose pelos granulócitos da subpopulação Q1 [EROs(-) e SaPI(+)]	98
Gráfico 12 -	Mediana e IIQ da intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos da subpopulação Q1 [EROs(-) e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	98

Gráfico 13 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de granulócitos na subpopulação Q2 [EROS(+)] e SaPI(+)]	100
Gráfico 14 -	Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROS (EROS+) na subpopulação Q2 [EROS(+)] e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	100
Gráfico 15 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos da subpopulação Q2 [EROS(+)] e SaPI(+)]	101
Gráfico 16 -	Mediana e IIQ da intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos da subpopulação Q2 [EROS(+)] e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	102
Gráfico 17 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs, entre as células EROs(+), na subpopulação Q2 [EROS(+)] e SaPI(+)]	104
Gráfico 18 -	Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos da subpopulação Q2 [EROS(+)] e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	104
Gráfico 19 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de células na subpopulação Q3 [EROS(-)] e SaPI(-)]	106
Gráfico 20 -	Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROS (EROS+) na subpopulação Q3 [EROS(-)] e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	106
Gráfico 21 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de células na subpopulação Q4 [EROS(+)] e SaPI(-)]	108
Gráfico 22 -	Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROs (EROS+) na subpopulação Q4 [EROS(+)] e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	108
Gráfico 23 -	Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos da subpopulação Q4 [EROS(+)] e SaPI(-)]	110
Gráfico 24 -	Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos da subpopulação Q4 [EROS(+)] e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).....	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Dosagens de Vitamina E e justificativas descritas na literatura.....	44
Quadro 2 -	Composição de cada um dos tubos durante a preparação das amostras para análise por Citometria de fluxo.....	56
Quadro 3 -	Observação dos valores do eritrograma (média e DP, mínimos e máximos) descritos em Benesi et al. (2012a) e os encontrados na avaliação dos bezerros Wagyu, até 30 dias de vida.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BOVINOS DA RAÇA WAGYU	21
2.2	IMUNIDADE	24
2.2.1	Transferência de imunidade passiva	26
2.2.1.1	Proteína sérica total (PST), globulinas e relação albumina:globulina..	27
2.2.1.2	Gama glutamyltransferase (GGT)	28
2.2.2	Fibrinogênio	29
2.2.3	Imunidade inata e neutrófilos	29
2.3	HEMOGRAMA	32
2.4	PRODUÇÃO DE RADICAIS OXIDATIVOS	33
2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR OXIDATIVA POR MEIO DA CITOMETRIA DE FLUXO	35
2.6	VITAMINA E	36
2.6.1	Composição	36
2.6.2	Formas disponíveis de Vitamina E	38
2.6.3	Funções	39
2.6.3.1	Interação com Selênio	39
2.6.3.2	Função antioxidante	40
2.6.4	Recomendações de Vitamina E	42
2.6.5	Efeitos da deficiência ou hipervitaminose E	46
2.6.5.1	Deficiência de Vitamina E	46
2.6.5.2	Hipervitaminose E	47
3	OBJETIVO	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS E MANEJO DA PROPRIEDADE	48
4.2	FORMAÇÃO DOS GRUPOS	49
4.3	COLHEITAS DE DADOS E AMOSTRAS	50
4.4	EXAMES LABORATORIAIS	52
4.4.1	Hemograma	52
4.4.2	Identificação da Transferência de imunidade passiva (TIP)	52
4.4.2.1	Proteína Sérica Total (PST), Globulinas e relação albumina:globulina (A:G)	53
4.4.3	Fibrinogênio	54
4.4.4	Produção intracelular de Peróxido de Hidrogênio	55
4.4.4.1	Preparo das amostras	55
4.4.4.2	Avaliação da produção de Peróxido de Hidrogênio por citometria de fluxo	57
4.4.4.3	Reagentes utilizados e preparação das soluções	59
4.4.4.3.1	PBS Solução mãe	59
4.4.4.3.2	PBS uso	59
4.4.4.3.3	EDTA dissódico (3mM)	60
4.4.4.3.4	Soluções de NaCl 0,2% e 1,6%	60
4.4.4.3.5	Solução de estoque (mãe) de DCFH-DA – 25 mM	60
4.4.4.3.6	Solução de uso de DCFH-DA	60
4.4.4.3.7	Solução tampão de Carbonato 0,1 M	61

4.4.4.3.8	<i>Staphylococcus aureus</i> conjugado com Iodeto de Propídeo (SaPI)....	61
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	EXAME FÍSICO.....	63
5.1.1	Ganho de peso (kg)	63
5.2	EXAMES LABORATORIAIS.....	65
5.2.1	Eritrograma	65
5.2.2	Leucograma	70
5.2.3	Bioquímica sérica	74
5.2.4	Considerações gerais sobre o Hemograma e a Bioquímica sérica	78
5.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR MEIO DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	79
5.3.1	Avaliação das porcentagens de granulócitos e intensidade de produção de EROs com e sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI	79
5.3.1.1	Avaliação da porcentagem de granulócitos produtores de EROs, e da intensidade desta, sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI	83
5.3.1.2	Produção de EROs pelos granulócitos, com estímulo pela fagocitose de SaPI	86
5.3.1.3	Considerações sobre avaliação dos granulócitos produzindo EROs, com ou sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI.....	90
5.3.2	Avaliação das quatro populações de granulócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4), classificados pela análise da fluorescência captada pelo detector FL1 em função daquela captada pelo FL3	91
5.3.2.1	Q1: granulócitos que estavam fagocitando SaPI, mas não estavam produzindo EROs (EROS- e SaPI+).....	96
5.3.2.1.1	<i>Porcentagem (%) de granulócitos em Q1</i>	96
5.3.2.1.2	<i>Intensidade de fagocitose pelos granulócitos em Q1</i>	97
5.3.2.2	Q2: granulócitos que estavam fagocitando SaPI e também, estavam produzindo EROs (EROS+ e SaPI+).....	99
5.3.2.2.1	<i>Porcentagem (%) de granulócitos em Q2</i>	99
5.3.2.2.2	<i>Intensidade de fagocitose pelos granulócitos em Q2</i>	101
5.3.2.2.3	<i>Intensidade de EROs pelos granulócitos em Q2</i>	103
5.3.2.3	Q3: granulócitos que não estavam fagocitando SaPI e também, não estavam produzindo EROs (EROS- e SaPI-).....	105
5.3.2.3.1	<i>Porcentagem (%) de granulócitos em Q3</i>	105
5.3.2.4	Q4: granulócitos que não estavam fagocitando SaPI, mas estavam produzindo EROs (EROS+ e SaPI-).....	107
5.3.2.4.1	<i>Porcentagem (%) de granulócitos em Q4</i>	107
5.3.2.4.2	<i>Intensidade de EROs pelos granulócitos em Q4</i>	109
5.3.2.5	Considerações sobre a dinâmica das quatro subpopulações de granulócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4).	111
5.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE O EFEITO VITAMINA E.....	113
6	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	116
	APÊNDICE A	127
	APÊNDICE B	128

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos comerciais do mundo, com mais de 215 milhões de animais, em destaque diante das atividades econômicas de maior importância no país (IBGE, 2015), gerando em torno de 67 bilhões de reais anuais (BRASIL, 2014). Com isso o crescimento do setor depende também da quantidade de bezerros nascidos, pois estes serão os futuros produtores de leite e carne, sendo, em âmbito nacional, aproximadamente 44,6 milhões de bezerros nascidos ao ano (BRASIL, 2006). Por este motivo, as doenças que acometem estes animais, geram prejuízos econômicos devido à morbidade, custos de tratamentos, diminuição da produção e lucratividade, além da mortalidade (SEINO, 2014). Segundo Ortolani (2016) a mortalidade média nacional de bezerros de corte é de 8% ao ano, sendo que o ideal seria de no máximo 4%. Propriedades com bons sistemas de manejo podem apresentar surtos de afecções em bezerros neonatos, ultrapassando os 10%. Um terço destes animais morrem com dois a três dias de vida.

A susceptibilidade às doenças decorre de diversos fatores, como a interação com os agentes infecciosos, imunidade dos animais, as condições gerais de sanidade e higiene, além do manejo zootécnico empreendido (MACHADO NETO et al., 2004). Dentre esses fatores, a imunidade dos animais é um dos mais importantes (BARRINGTON; PARISH, 2001).

A imunidade dos bezerros, nos primeiros meses de vida, depende de dois principais fatores: a transferência de imunidade passiva (TIP), que ocorre pela passagem de proteínas de importância imunológica da mãe para o bezerro, por meio do colostro (BENESI, 1992) e também, a imunidade inata, da qual faz parte a imunidade celular, envolvendo células responsáveis pela resposta inflamatória contra infecções, como os neutrófilos (CLICH E VAZ, 2009).

Esta imunidade pode variar de acordo com a raça de bovinos. Ohtsuka et al. (2011a), observaram diferenças entre a imunidade de bezerros da raça Holandesa e aqueles da raça japonesa Wagyu. Destaca, que os bezerros Wagyu são muito mais susceptíveis as inúmeras afecções e à morte nas primeiras semanas de vida, em comparação aos bezerros holandeses, supondo que uma

das causas da maior susceptibilidade destes animais, se deve ao fato de que são imunologicamente menos competentes.

Diante destes fatos, torna-se necessária a adoção de medidas preventivas e o desenvolvimento de pesquisas, para a diminuição do número e da gravidade das afecções que acometem os bezerros, não apenas no Brasil, mas no mundo todo. Uma das estratégias apontadas por Otomaru et al. (2015), é a suplementação dos bezerros da raça Wagyu com Vitamina E, para aumento de leucócitos no sangue periférico e consequente melhoria da imunidade destes animais. No mesmo contexto, o presente trabalho avaliou a função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu, durante os primeiros dois meses de idade, após suplementação com Vitamina E injetável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BOVINOS DA RAÇA WAGYU

Segundo o histórico descrito pela ABCWAGYU (2017), a espécie bovina foi introduzida no Japão, primeiramente na região de Shikoku ao sul do país, a partir da Ásia, através da península coreana, por volta do século II d. C., com a finalidade de fornecer tração ao cultivo de arroz. Os rebanhos tendiam ao isolamento em determinadas regiões do país devido à dificuldade de locomoção para viagens de grande extensão em terrenos montanhosos, fato que contribuiu para o aumento da consanguinidade de gerações e apuração de características fenotípicas destes animais. Além deste fato, em 1635, o Japão teve seu rebanho bovino oficialmente fechado para importações e exportações por aproximadamente 200 anos, até 1854. Com a “Restauração Meiji”, em 1868, a qual implicou em inúmeras modificações políticas e governamentais no país, o governo japonês estimulou a importação de outras raças bovinas europeias para o cruzamento. Porém cada uma das regiões do país apresentou uma preferência de raças para importações, de modo que a variedade regional tornou-se mais acentuada, sendo constatado, no ano de 1910, que os cruzamentos com raças europeias, não trouxeram muitos benefícios aos rebanhos bovinos japoneses, provocando novamente o fechamento oficial do rebanho nacional para cruzamentos.

Assim, a grande variedade regional dos bovinos japoneses trouxe destaque para determinadas localidades, como as regiões de Tottori e Tajima, onde desenvolveu-se o Black Wagyu (bovino Wagyu de pelagem preta) e as regiões das ilhas de Kyusho e Kochi, onde se deu origem ao Red Wagyu (bovino Wagyu de pelagem avermelhada).

O gado da região de Tajima, atualmente denominada Hyogo Prefecture, era em sua maioria utilizado para tração, à frente de carros de boi de madeira, sendo, portanto, selecionado para o maior desenvolvimento da região cranial do corpo, mais fortalecidas e pesadas, além de apresentarem baixa estatura. Apresentavam, porém, ampla área de olho de lombo (área do músculo

Longissimus dorsi) e carne de excelente qualidade. Em contrapartida, o gado da região de Tottori era utilizado para transporte de carga para as indústrias siderúrgicas da região, sendo, portanto, selecionados pela força de sua musculatura dorsal. Sua carne é considerada de qualidade moderada em comparação ao gado de Tajima, porém as fêmeas apresentam excelente habilidade materna (ABCWAGYU, 2017).

As diferenças entre as duas linhagens descritas de Black Wagyu, podem ser observadas até os dias de hoje.

As duas linhagens de Red Wagyu, (a linhagem Kochi, desenvolvida na região de Kochi e a linhagem Kumamoto, desenvolvida na região de Kyushu) também apresentam diferenças entre si. A linhagem Red Wagyu Kochi foi fortemente influenciada pela raça Korean. Portanto apresenta-se geralmente com menor tamanho corporal, quando comparado à linhagem Kumamoto, pois esta possui grande influência da raça Simental em sua genética. Os bovinos Red Wagyu Kumamoto foram criados em uma região com relativa abundância de pastagens, contribuindo para que estes animais fossem considerados os bovinos de corte com maior semelhança com o gado de corte europeu e americano (ABCWAGYU, 2017).

A Raça Wagyu difundiu-se pelo mundo, tornando-se muito importante no mercado agropecuário de diversos países, ganhando cada vez mais espaço e atraindo muitos pecuaristas, por ser uma das raças utilizadas para corte, mais admiradas em todo o mundo. Atualmente, os maiores rebanhos bovinos da raça Wagyu estão no Japão, Estados Unidos e Austrália (AWA, 2017). No Brasil os primeiros animais, embriões e sêmen de bovinos Wagyu, foram importados dos Estados Unidos, na década de 1990, quando se iniciou a adaptação dos animais, os quais demonstraram rusticidade suficiente para permanecer em clima tropical e manter suas principais características desejáveis (WHATELY, 2012).

A característica dos bovinos Wagyu, que desperta maior interesse comercial mundial é o marmoreio da carne destes animais, ou seja, a infiltração de adipócitos que entremeiam as fibras musculares, uma característica estabelecida geneticamente e ainda muito estudada por pesquisadores de todo o mundo. O marmoreio da carne depende de diversos fatores: genéticos (em que se destaca a linhagem Black Wagyu Tajima), alimentação, manejo, exercício físico dos animais, entre outros fatores muito discutidos e adaptados por

pecuaristas e pesquisadores de diferentes regiões do planeta. O marmoreio da carne confere à mesma um sabor especial quando preparada e aquecida, devido ao derretimento da gordura em meio à musculatura. Tal característica confere suculência à carne, ótima sensação ao paladar, o que tornou a carne de Wagyu, uma das mais apreciadas na gastronomia de todo o mundo, além de ser uma das carnes de maior valor econômico. A carne dos bovinos Wagyu também é conhecida como Kobe Beef, pois em janeiro de 1868, o Porto de Kobe, no Japão, foi aberto para o comércio internacional. Tal situação permitiu o aporte de estrangeiros, que apreciaram a carne dos bovinos da região de Kobe e foram responsáveis por torná-la mundialmente conhecida como Kobe Beef, que é hoje uma das atrações do país (ABCWAGYU, 2017).

Atualmente, têm sido desenvolvidas inúmeras pesquisas com os bovinos da raça Wagyu em todo o mundo, envolvendo diversas avaliações e linhas de pesquisa. Exemplificam-se o trabalho de Gotoh e Joo (2016), o qual caracterizou os benefícios do alto grau de marmoreio da carne dos bovinos Wagyu e o de Motoyama, Sasaki e Watanabe (2016) que estudaram os fatores que contribuem para a qualidade da carne advinda do gado japonês. Junto a estes estudos, também se observa o desenvolvimento de pesquisas que comparam os bovinos Wagyu com bovinos de outras raças, não somente utilizadas para corte, como também raças voltadas para a produção de leite como a Holandesa. O trabalho de Yonesaka et al. (2016) comparou a estrutura genética de bovinos asiáticos Wagyu com bovinos Europeus. Por sua vez, o estudo de Guo et al. (2017) comparou a expressão genética, para o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo de bovinos Wagyu com a de holandeses. Tais autores utilizaram a justificativa de que estas duas raças bovinas são as mais difundidas e utilizadas no Japão e que são observadas inúmeras diferenças biológicas entre as duas, envolvendo diferentes características morfológicas, clínicas e comportamentais.

Estas diferenças também atingem os bezerros Wagyu, como foi demonstrado no trabalho de Ohtsuka et al. (2011a), que compararam 105 bezerros Wagyu com 95 bezerros Holandeses, ao longo das primeiras 14 semanas de vida e observaram diferenças na imunidade entre as duas raças. Estes autores afirmaram, também, que os bezerros Wagyu são muito mais susceptíveis a inúmeras afecções e à morte nas primeiras semanas de vida, em comparação aos bezerros da raça Holandesa, supondo que uma das causas da

maior susceptibilidade destes animais, se deve ao fato de que são imunologicamente menos competentes que os bezerros holandeses. Especialmente, estes autores avaliaram as populações de leucócitos no sangue periférico dos bezerros e encontraram menor número de linfócitos T gamma-delta nos bezerros Wagyu, em comparação com aquele dos bezerros Holandeses. Atribuindo a este tipo celular, a responsabilidade por grande parte da proteção contra infecções nos bovinos, justificando, assim, a maior susceptibilidade destes bezerros. Ohtsuka et al. (2011b), também relacionaram a esta justificativa, o desenvolvimento mais frequente de diarreia neonatal dos bezerros Wagyu. Tsuchida et al. (2010) afirmam que podem haver influências genéticas, porém ainda não totalmente elucidadas, para o comportamento imunológico diferenciado do gado Wagyu. De fato, as células T gamma-delta representam a principal fonte de interleucina-17 (IL-17), que é responsável pelo recrutamento de células para o tecido inflamado (ROARK et al., 2008).

Ohtsuka et al. (2011a) também encontraram menores porcentagens de linfócitos ativos com produção de interleucina 2 (IL-2), em bezerros Wagyu com idades entre 4 a 6 e 8 a 10 semanas, além de menor sensibilidade à IL-2 nestes animais entre 6 a 8 e 10 a 14 semanas de vida.

A IL-2 é uma proteína liberada na circulação sanguínea em casos de infecção por microrganismos. A mesma possui seus receptores nas paredes celulares dos linfócitos e quando ligadas à estes receptores intermediam a resposta imune de linfócitos T contra infecções, além de ser, também, responsável pela maturação dos linfócitos T e B (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Adicionalmente, Ohtsuka et al. (2005) afirmaram que a imunidade dos bezerros Wagyu e sua capacidade de responder a infecções, depende diretamente da nutrição destes animais.

2.2 IMUNIDADE

Na busca de justificativas para a maior susceptibilidade dos bezerros Wagyu ao desenvolvimento de doenças, quando comparados à bovinos de outras raças, os trabalhos desenvolvidos trataram principalmente da imunidade

destes animais. Tais pesquisas avaliaram, primordialmente, a imunidade inata. Em sua maioria, analisaram a quantidade e ação de linfócitos, como o trabalho de Ohtsuka et al. (2011a), porém não foram encontrados trabalhos que analisassem o perfil e a função dos granulócitos dos bezerros Wagyu nos primeiros meses de vida, fator imunológico que pode esclarecer muitas dúvidas sobre o comportamento destes animais.

Segundo Benesi et al. (2012b), ao nascimento, os bezerros apresentam um predomínio de Neutrófilos circulantes no sangue, em relação aos linfócitos (na contagem total de ambos os tipos celulares): a chamada relação Neutrófilo:Linfócito (Ne:Li). Esta relação encontra-se invertida até o final da primeira semana de vida dos animais, onde os mesmos passam a apresentar perfil predominantemente linfocítico, com o aumento do número de linfócitos e diminuição do número de neutrófilos circulantes. Novo et al. (2015), afirmam que esta inversão pode ocorrer por volta do quarto dia pós-natal, devido a redução da ação de glicocorticoides endógenos circulantes.

A imunidade dos bezerros, nos primeiros meses de vida, depende de dois componentes principais classificados neste trabalho como: transferência de imunidade passiva (TIP) e a imunidade inata (CHRISTOPHER et al., 2008), a qual, precede a imunidade adaptativa. A TIP é conferida por transferência de imunoglobulinas da mãe para o bezerro, por meio do colostro (BENESI, 1992 e CORTESE, 2009) e está descrita no item 2.2.1 (Transferência de imunidade passiva). A imunidade inata compreende barreiras físicas, químicas e celulares para proteção do organismo, incluindo células fagocíticas e que participam de respostas inflamatórias, como os neutrófilos (CLICH E VAZ, 2009), tipo celular que será alvo do presente estudo e que está descrito no item 2.2.2 (Imunidade inata e neutrófilos). Em sequência às manifestações imediatas da imunidade inata dos animais e dependente da mesma, encontram-se os componentes da imunidade adaptativa celular e humoral. A celular é formada por células efectoras antígeno específicas e células de memória que impedem a reinfecção pelo mesmo microrganismo. Por sua vez a imunidade adaptativa humoral ocorre através da produção de anticorpos específicos para determinados antígenos (JANEWAY et al., 2004).

2.2.1 Transferência de imunidade passiva

A transferência de imunoglobulinas das mães aos fetos, nas espécies ruminantes ocorre principalmente na fase pós-nascimento, pois a placenta desses animais é do tipo sinepteliocorial, a qual impede a passagem transplacentária de anticorpos maternos ao feto. Tal fato, torna os fetos e neonatos imunologicamente menos competentes (ou, ao menos, hipogamaglobulinêmicos) ao nascimento. Desta forma, torna-se imprescindível a mamada do colostro nas primeiras horas pós nascimento, pois apenas desta forma ocorre a passagem das imunoglobulinas da mãe para o feto, por meio da absorção intestinal do neonato. Tal fato é denominado transferência de imunidade passiva (TIP) (BENESI, 1992). Nos casos em que existem problemas na produção do colostro pela mãe, afetando quantidade e/ou qualidade deste, ou até mesmo alterações na ingestão e absorção deste colostro pelo neonato, pode ocorrer a chamada falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) (BENESI, 1992 e FEITOSA et al., 2001), podendo predispor os recém-nascidos às doenças frequentemente vistas na fase neonatal (RADOSTITS et al., 2002).

O diagnóstico da FTIP em bezerros deve ser realizado durante os primeiros dias de vida para que seja possível a realização de intervenções clínicas (THRALL et al., 2004). A primeira semana de vida é considerada o melhor período, pois, a partir desta, inicia-se o catabolismo das imunoglobulinas do colostro e a possível produção das mesmas pelo bezerro (BARRINGTON e PARISH, 2001). Se realizado após as primeiras 24 horas pós nascimento, o diagnóstico pode ser mais confiável, pois pode-se garantir a total absorção das imunoglobulinas pelo neonato (QUIGLEY, 2001).

Existem duas formas de diagnóstico para a FTIP: a mensuração da concentração de imunoglobulinas séricas dos bezerros neonatos de forma direta ou indireta. São utilizados para ambos métodos quantitativos e semiquantitativos, com variada sensibilidade e especificidade. A forma direta é realizada por mensuração da imunoglobulina G (IgG), enquanto a forma indireta pode ser feita com as medidas de proteínas séricas, como proteína sérica total e globulinas, além da atividade da enzima gama glutamiltransferase (GGT), determinação das

gamaglobulinas por eletroforese, teste de coagulação do glutaraldeído e testes de precipitação por sulfito de sódio ou por sulfato de zinco (SEINO, 2014).

No entanto, é importante o que Seino (2014) ressalta, que as concentrações de proteínas séricas dos bezerros podem variar de acordo com as condições e sistemas de criação animal, a raça, a localidade e a exposição dos animais à patógenos, além do fato da imunidade humoral não ser a única responsável pela defesa imunitária.

2.2.1.1 Proteína sérica total (PST), globulinas e relação albumina:globulina

Os valores de proteína sérica de bezerros e potros, variam conforme a idade dos mesmos. Ao nascimento, estes valores são baixos e aumentam após a ingestão do colostro, devido à absorção de imunoglobulinas (FELDMAN; ZINKIL; JAIN, 2000). Estes valores estabilizam-se a partir do momento em que há produção endógena de proteínas pelo neonato (HUSBAND; BRANDON; LASCELLES, 1972).

Os valores de albumina são mais baixos ao nascimento e se elevam nos primeiros dois meses de vida, devido ao desenvolvimento da capacidade de síntese dessa proteína pelos bezerros (KANEKO; HARHEY; BRUSS, 1997). O aumento nos valores séricos de albumina também pode ocorrer devido à quantidade de compostos nitrogenados oferecidos na dieta dos animais conforme a idade dos mesmos (FAGLIARI et al., 1998; FEITOSA et al., 2001; LEAL et al., 2003).

Os valores de referência para a PST são descritos por diversos autores. Naylor et al. (1977) observaram menor morbidade de bezerros com 6,0 g/dL de PST, enquanto Rea et al. (1996) registraram maior morbidade em bezerros que apresentaram valores menores que 4,5 g/dL de PST. Feitosa et al. (2010), destacaram a presença de FTIP pode ser considerada quando os valores de Proteína estão abaixo de 5,0 g/dL; enquanto que, para Weaver et al. (2000), quando abaixo de 5,5 g/dL.

A relação albumina:globulina (A:G) revela alterações nas concentrações séricas de proteínas. Segundo Kaneko, Harhey e Bruss (1997), neonatos com FTIP apresentam um aumento nessa relação devido à hipogamaglobulinemia. Vettorato et al. (2012) verificaram que a relação A:G, pode caracterizar FTIP quando apresenta-se menor que 1, no segundo dia de vida dos bezerros e maior que 1 ao final do primeiro mês. De acordo com Rocha et al. (2012), os valores séricos de globulinas representam um parâmetro adequado para identificação da FTIP, pois apresentam correlação com os valores de PT, GGT e imunoglobulinas, tendo seus valores variando de 3,93 g/dL à 4,02 g/dL.

2.2.1.2 Gama glutamiltransferase (GGT)

A avaliação da atividade sérica da enzima GGT no sangue dos bezerros neonatos deve ser realizada durante a primeira semana de vida, pois nesse período existe uma diminuição gradual da mesma, em comparação com as primeiras 12 a 24 horas de vida do neonato, quando o valor da GGT atinge níveis máximos (FEITOSA, 1998). A meia vida da GGT no colostro é relativamente curta e a diminuição sérica nos bezerros da raça Holandesa continua até os 30 a 40 dias de vida, quando se estabiliza e mantém níveis próximos aos encontrados em bovinos adultos (FEITOSA et al., 1998; SEINO, 2014). A rápida execução e o baixo custo são algumas das vantagens da avaliação da atividade sérica da GGT, como teste indireto, para o diagnóstico de FTIP (FEITOSA et al., 2001).

No colostro bovino a concentração de GGT é duas a três vezes maior que a do leite e cerca de 300 vezes maior que a presente no soro dos neonatos após a ingestão do colostro, com adequada TIP (THOMPSON; PAULI, 1981). Valores abaixo de 50 UI/L de GGT sérica, podem indicar um bezerro com FTIP pois, para bovinos da raça Holandesa, a concentração sérica de GGT de 200 UI/L, seria correspondente a 1000 mg/dL de IgG, no primeiro dia de vida, podendo baixar, posteriormente, para 100 UI/L de GGT e em seguida para 75UI/L no quarto e décimo primeiro dia de vida respectivamente (SEINO, 2014).

2.2.2 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma proteína plasmática de fase aguda produzida, pelos hepatócitos. São produzidas em maiores quantidades pelos bovinos em casos de inflamação aguda, pois nestes casos os processos enzimáticos convertem a protrombina em trombina e esta, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, com o objetivo final de impedir a perda de sangue dos vasos sanguíneos. A mensuração das quantidades de fibrinogênio circulantes, não faz parte do processo de diagnóstico de FTIP, porém pode ser utilizado para avaliar o estado geral de saúde dos animais e a possível ocorrência de afecções. Por isso, torna-se um importante exame complementar, aliado ao exame físico. A mensuração do fibrinogênio circulante pode ser realizada pelo método de precipitação pelo calor (56 a 58°C), uma técnica semiquantitativa. É considerada de sensibilidade adequada para avaliar quadros de hiperfibrinogenemia, porém inadequada para avaliar quadros de hipofibrinogenemia (STOCKHAM E SCOTT, 2011). Segundo Radostits et al. (2002), os valores de fibrinogênio para bovinos saudáveis variam de 200 a 700 mg/dL.

2.2.3 Imunidade inata e neutrófilos

A imunidade inata compreende vários tipos de mecanismos de defesa do organismo: aqueles mediados por barreiras físicas, como a pele, que impede entrada de microrganismos nos diversos tecidos corporais; os mediados por barreiras químicas, como o pH abomasal dos bezerros, responsável por eliminar boa parte dos agentes patogênicos ingeridos; além daqueles mediados por células fagocíticas, como os neutrófilos.

Todas as células envolvidas no sistema imune são derivadas de células tronco hemopoiéticas (CALICH e VAZ, 2009).

As células fagocíticas, ou fagócitos, pertencem a duas linhagens importantes: os mononucleares que correspondem a monócitos e macrófagos e

os granulócitos polimorfonucleares, denominados assim por apresentarem núcleo polimórficos, ou seja, irregular e multilobulado (com lobulação variada). Devido ao diferente comportamento de seus grânulos frente a corantes ácidos e básicos, os polimorfonucleares são denominados: neutrófilos, basófilos e eosinófilos, os quais, possuem diferentes funções entre si.

Todas estas células estão envolvidas na reação inflamatória, processo que ocorre após a entrada de microrganismos patogênicos que ultrapassam as primeiras barreiras físicas do corpo e conseguem instalar-se em determinados locais do corpo afim de iniciar um processo infeccioso. Com a infecção local, inicia-se um processo inflamatório. A inflamação caracteriza-se por dor, calor, rubor e edema no local da infecção, devido a alterações na circulação sanguínea local (JANEWAY et al., 2004), em que os vasos sanguíneos dilatam-se e tornam-se permeáveis a fluidos e proteínas, além das células endoteliais facilitarem por meio da expressão de proteínas em suas superfícies, a passagem de células inflamatórias mono e polimorfonucleares (ABBAS; LICHTMAN e POBER, 1997).

Os fagócitos mononucleares podem viver por meses ou anos e podem ser células circulantes, como os monócitos que se transformam em macrófagos, quando migram através das paredes dos vasos sanguíneos para o interstício de diversos órgãos, tornando-se células residentes, capazes de realizar a fagocitose e organismos (CALICH E VAZ, 2009 e ROITT; BROSTOFF e MALE, 2003). Além disso, entre os mononucleares, estão as células apresentadoras de antígeno, as quais são responsáveis por internalizar, processar e apresentar peptídeos antigênicos aos Linfócitos T (ROITT; BROSTOFF e MALE, 2003).

Os granulócitos polimorfonucleares, representados em sua maioria por neutrófilos (mais de 95%) são produzidos na medula óssea a uma média de sete milhões de células por minuto e possuem uma vida média curta, de 2 a 3 dias na circulação sanguínea. Estes neutrófilos não apresentam especificidade inerente para antígenos, porém têm como principal ação a fagocitose e a destruição de agentes patogênicos (ROITT; BROSTOFF e MALE, 2003), por meio da liberação de grânulos citoplasmáticos sobre o organismo fagocitado (PAAPE et al., 2003). Estes polimorfonucleares circulantes, fazem parte do “pool” circulante (ROITT; BROSTOFF e MALE, 2003), também chamado de compartimento circulante de neutrófilos (CCN) e que são colhidos em amostras de sangue. Eles têm a capacidade de realizar um processo de marginação, aderindo-se às células

endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, por ação de citocinas inflamatórias, incluindo a interleucina -1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) de macrófagos, que estimulam as células endoteliais a produzir e expressar proteínas de adesão (selectinas) que medeiam a migração e o “rolamento” dos neutrófilos sobre as mesmas (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Esta expressão das selectinas é, também, dependente das quantidades de cortisol circulantes (COSTA et al., 2017). Posteriormente os neutrófilos passam entre estas células endoteliais para deixar a circulação, processo chamado de diapedese (ROITT; BROSTOFF e MALE, 2003). A diapedese ocorre com o auxílio de mediadores químicos endógenos, que incluem Leucotrieno B4 (LTB4), por exemplo, que ativam neutrófilos para a expressão de integrinas na membrana, de alta afinidade, que se ligam aos receptores das células endoteliais que medeiam o processo de migração para os tecidos. Os neutrófilos, quando aderidos às células endoteliais, passam a fazer parte do “pool” marginal de neutrófilos, ou compartimento marginal de neutrófilos (CMN). Os neutrófilos contidos no CMN podem ser recrutados conforme a necessidade e retornar ao CCN. Por outro lado, podem entrar nos tecidos, onde farão parte do compartimento tecidual de neutrófilos (CTN) e serão conduzidos a locais específicos por ação de substâncias quimiotáticas, como a interleucina-8 (IL-8), entre outras. Uma vez no compartimento tecidual, dificilmente os neutrófilos retornam à circulação e na ausência de doenças, geralmente morrem nos tecidos do sistema respiratório e gastrointestinal.

Na maioria das espécies de mamíferos a relação CMN:CCN é próxima de 1.

Deste modo, durante a análise de sangue coletado dos animais, alguns fatores podem influenciar a concentração de neutrófilos sanguíneos mensurados, como:

- A distribuição de neutrófilos entre CCN e CMN,
- Migração dos neutrófilos maduros para os tecidos enquanto os neutrófilos imaturos permanecem no CCN,
- Produção de neutrófilos, incluindo sua proliferação e diferenciação, além da efetividade de maturação no estágio de mielócito
- Liberação de neutrófilos da medula para o CCN, prioritária aos mais maduros (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Para a execução de suas funções de fagocitose e destruição de agentes patogênicos, os neutrófilos possuem um arsenal de proteínas antibióticas armazenadas em dois tipos principais de grânulos, os primários e os secundários. Os grânulos primários (azurofílicos) são lisossomos que contêm hidrolases ácidas, mieloperoxidase e muramidase (lisozima). Os grânulos secundários (específicos) contêm lactoferrina e lisozima. Além destas, os grânulos também contêm altas concentrações de proteínas antibióticas como defensinas, seprocidinas, catelicidinas e proteínas indutoras da permeabilidade bacteriana. Após a fagocitose, os organismos internalizados ficam contidos em vacúolos denominados fagossomos, os quais se fundem com os lisossomos para formar os fagolisossomos (ROITT; BROSTOFF e MALE, 2003). Após a fagocitose, ocorre a morte dos neutrófilos (ABBAS; LICHTMAN e POBER, 1997). Neste contexto, Swain et al. (2015), afirmam que a apoptose dos neutrófilos ocorre lentamente após a fagocitose.

Durante sua atividade de fagocitose, os neutrófilos consomem oxigênio e liberam radicais oxidativos chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs), que colaboram para a destruição de agentes patogênicos, pois são tóxicos a bactérias e outros organismos. Eles podem ser mensurados e correlacionados com a atividade e eficiência destas células (JANEWAY et al., 2004), sendo melhor descritos no item 2.4 (Produção de radicais oxidativos).

Nos casos em que o patógeno a ser destruído é muito grande, o mesmo é envolvido por um grupo de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, os quais liberam o conteúdo de seus grânulos e os radicais oxidativos para o meio extracelular por meio de exocitose (ABBAS; LICHTMAN e POBER, 1997).

2.3 HEMOGRAMA

Segundo Benesi et al. (2012b), o diagnóstico, prognóstico e tratamento das doenças, exige, em muitas situações, além do exame físico, a complementação com exames laboratoriais auxiliares, como o hemograma. A adequada interpretação dos resultados dos exames complementares exige a colheita do máximo de informações por meio do exame físico, o conhecimento

da fisiologia dos órgãos ou sistemas afetados e da patogenia das enfermidades, além da necessidade de utilização de valores de referência específicos, que considerem a espécie, a raça, a idade, o sexo e de fatores ambientais/climáticos de onde vivem os animais. Entretanto, a maioria dos trabalhos realizados com bovinos Wagyu, utilizam referências hematológicas de bovinos de outras raças, fato que pode mascarar particularidades da raça japonesa.

2.4 PRODUÇÃO DE RADICAIS OXIDATIVOS

O oxigênio, considerado como receptor final de elétrons, durante o processo de respiração celular, através da fosforilação oxidativa, é o elemento responsável pelo aumento da eficiência na produção de energia celular (ERNSTER, 1986). Quando este processo passou a ocorrer em organismos anaeróbios, tornou-se um marco histórico na evolução biológica (SILVEIRA, 2004).

A fosforilação oxidativa pode ocorrer de duas formas distintas. A primeira, envolve a redução tetravalente de 95 a 98% do oxigênio e ocorre a partir da enzima citocromo oxidase, na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (ERNSTER 1986). Em contrapartida a segunda via da fosforilação oxidativa envolve os 2 a 5% de oxigênio restantes, os quais podem sofrer redução univalente, dando origem aos radicais oxidativos (SILVEIRA 2004), também denominados EROs. As EROs mais comuns são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (ΔGO_2). São também produzidos o ânion superóxido (O_2^-) e a hidroxila ($\cdot OH$), ambos mantendo um elétron desemparelhado em sua estrutura (AZEDO, 2007).

Além da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, os fagócitos também são capazes de gerar radicais oxidativos através da ação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, localizada na superfície celular, em um processo que pode aumentar em até 100 vezes o consumo de oxigênio celular (JANEWAY et al., 2004). Este processo envolve a ativação da enzima tirosina quinase (PTK), a qual possui expressão restrita aos fagócitos, e

dependente da enzima proteína quinase C (PKC) (WELCH et al., 1996; HODGSON et al., 2006).

Pela via enzimática da oxidase, o oxigênio é reduzido à O^{2-} e por meio da ação da superóxido dismutase (SOD), é convertido em H_2O_2 , que por sua vez, através de via não enzimática, é convertido em O^{2-} por reação catalizadora intermediada pelo Fe^{2+} . Em contrapartida a enzima mieloperoxidase (MPO) e o H_2O_2 no interior do fagolisossomo dos fagócitos formam um complexo capaz de reagir com íons cloreto, formando agentes antimicrobianos como o ácido hipocloroso, o qual tem ação direta sobre patógenos, além de reagir com compostos nitrogenados, formando outros altamente reativos como as cloraminas (AZEDO, 2007).

Além das EROs existem também as espécies reativas de Nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (ON), por exemplo, o qual tem sua produção na reação entre arginina e O_2 , intermediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). O ON é menos reativo, quando comparado à $\cdot OH$, porém sua interação com o O^{2-} produz o peroxinitrito ($ONOO^-$), uma ERN que, decomposta em pH fisiológico, pode gerar compostos oxidantes (SILVEIRA, 2004 e AZEDO, 2007).

Os EROs e ERNs são utilizados positivamente pelos fagócitos para a eliminação dos patógenos. Porém quando presentes em altos níveis, no interior do citoplasma, na circulação sanguínea e nos tecidos, estas espécies reativas podem gerar efeitos deletérios às próprias células, agindo em seu interior, bem como no organismo como um todo. Estes efeitos são também chamados de estresse oxidativo, os quais, podem comprometer atividades celulares devido à oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Por esse motivo, com a função de minimizar a ação oxidativa, diferentes tipos de células apresentam sistemas de proteção antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os não enzimáticos estão as Vitaminas E, C e A, a ubiquinona, a glutathiona reduzida (GSH), o ácido úrico, a L-cisteína, a glicose e a fenilalanina. Por sua vez os enzimáticos envolvem enzimas responsáveis pela remoção de oxigênio dos hidroperóxidos orgânicos e do H_2O_2 , como a SOD, glutathiona peroxidase (GSH-PX), catalase (CAT) e glutathiona redutase (GSSG-GR). Por sua vez, os teores de $\cdot OH$, ON, $ONOO^-$ nos tecidos, são regulados pela quantidade de oxigênio disponível às células, devido à ausência de enzimas oxidantes específicas para os mesmos (AZEDO, 2007).

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR OXIDATIVA POR MEIO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Existem diferentes métodos descritos na literatura, para a mensuração da atividade celular oxidativa. Para todos eles torna-se necessário o isolamento das populações celulares a serem analisadas (KAMPEM et al., 2004a). Admite-se que estas populações apresentem comportamento homogêneo (BASS et al., 1983).

Uma das técnicas desenvolvidas para tal é a Citometria de Fluxo, em que se utiliza um equipamento denominado Citômetro de Fluxo para avaliar quantitativa e qualitativamente células em suspensão (ROITT; BROSTOFF e MALE, 1985). Neste processo, as células são agrupadas de acordo com suas características morfológicas de tamanho relativo (FSC – Forward scatter characteristic) e granulidade e complexidade interna (SSC – Side scatter characteristic), mensurados através de um fluxo hidrodinâmico, mecanismos ópticos, radiação laser e recursos de informática (MCCOY, 1994 e AZEDO, 2007)

Segundo Azedo (2007), em 1983 os primeiros a utilizar a citometria de fluxo para avaliar a produção de H_2O_2 por neutrófilos, foram Bass et al., (1983), adaptando uma técnica descrita em 1965 por Brandt e Keston, que utilizava o diacetato de 2,7-Diclorohidrofluoresceína (DCFH-DA) para mensurar H_2O_2 , em soluções aquosas sobrenadantes de cultivos celulares.

A adição de DCFH-DA às soluções preparadas para citometria de fluxo, se deve ao fato de que, o grupo diacetato é apolar, portanto o DCFH-DA difunde-se através da parede celular em diferentes tecidos. Em seguida, ocorre a hidrólise do grupo diacetato no citoplasma através de esterases, liberando então as moléculas de DCFH polares e sem a capacidade de difusão nas membranas celulares. Durante o metabolismo oxidativo celular ocorre a oxidação das moléculas de DCFH pelo H_2O_2 e portanto, a formação de moléculas de 2,7-diclorofluoresceína (DCF), um componente intracelular de alta fluorescência (BASS et al., 1993). Hirabayashi et al. (1985) afirmam que existe uma relação de proporção direta entre o metabolismo respiratório celular e a presença de fluorescência de DCF, indicando que a mesma seja mediada apenas pela

produção de H_2O_2 . Além disso, Silveira (2003) demonstrou que o DCF apresenta baixa especificidade por outros radicais oxidativos. Portanto com a adição de DCFH-DA nos ensaios para citometria de fluxo, é possível mensurar quantitativamente a atividade das células individualmente (BASS et al., 1993).

Para aumentar a produção de radicais oxidativos nas reações de preparação de amostras para a citometria de fluxo, aumentando assim a fluorescência de DCF, é possível a realização de estímulo através da adição de bactérias opsonizadas como o *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SaPI), assim como de outros compostos como citocinas, LPS e *Escherichia coli* (HODGSON; WATKINS e BAYANE, 2006). Este estímulo ocorre através da interação destes componentes e a membrana celular dos fagócitos ou com o citocromo b558, no interior dos grânulos citoplasmáticos, induzindo o aumento do consumo de oxigênio celular pelo complexo NADPH oxidase (AZEDO, 2007).

Recentemente, a citometria de fluxo tem sido uma técnica bastante utilizada para a análise da função dos granulócitos. É possível avaliar a proporção de células que realizam a fagocitose de bactérias, como nos casos em que se utiliza SaPI, por exemplo, bem como as que produzem EROs e a intensidade das mesmas. Além disso, é relativamente rápida, pois dispensa a separação prévia das populações de leucócitos e utiliza um menor número de células para avaliação, além de amostras com pequena quantidade (AZEDO, 2007 e KAMPEN et al., 2004a).

2.6 VITAMINA E

2.6.1 Composição

Vitaminas são compostos orgânicos essenciais para metabolismo do corpo de todos os seres vivos. Possuem inúmeras funções fisiológicas, que incluem manutenção de funções vitais e reprodutivas, bem-estar, crescimento,

desenvolvimento, ganho de peso, imunidade, entre outras. Dietas deficientes em vitaminas (ou a má absorção destas) podem trazer inúmeras consequências para os animais, como doenças e a diminuição da capacidade de defesa contra as mesmas, pois a maioria das espécies animais não possuem a capacidade de produzir suas próprias vitaminas em quantidades suficientes para suprir suas necessidades. Portanto dependem das vitaminas fornecidas na alimentação.

As vitaminas são divididas em dois grupos: As hidrossolúveis como Vitaminas B e C e as lipossolúveis, como as Vitaminas A, K, D e E (ALBERTS et al., 2002).

A Vitamina E é derivada de compostos originados de plantas, os tocoferóis e os tocotrienóis. Segundo a Comissão de nomenclaturas bioquímicas da IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry), o termo “Vitamina E” é utilizado genericamente para descrever compostos derivados de tocoferol ou tocotrienol que qualitativamente apresentam funções idênticas ao α -tocoferol, sendo todos estes compostos formados por um núcleo de hidroquinona e uma cadeia lateral de isoprenóides. Esta cadeia lateral diferencia os tocoferóis, os quais a possuem saturada, enquanto a cadeia lateral dos tocotrienóis é insaturada.

A molécula de α -tocoferol é a de maior atividade biológica, dentre os compostos de vitamina E presentes em alimentos e suplementos comerciais para animais. A posição de grupos metila ($-\text{CH}_3$), nos locais 5, 7 e 8 nos anéis aromáticos da molécula é o que diferencia o α -tocoferol (Figura 1), dos demais compostos que também podem ser chamados de Vitamina E (β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol, δ -tocotrienol) (SCOTT; NESTHEIM e YOUNG, 1982).

Figura 1 - Molécula de α -tocoferol.

(Fonte: Vitamina E, disponível em: <https://radicaislivres96.wordpress.com/antioxidantes/>, 2013)

2.6.2 Formas disponíveis de Vitamina E

A Vitamina E é quantificada em Unidades Internacionais (UI), em que 1 UI/kg equivale a 1 mg/kg de α -tocoferol acetato. Está disponível em sua forma natural e não-natural, porém ambas sofrem influências do meio, pois são altamente susceptíveis à oxidação. Podem, assim, perder sua estabilidade molecular facilmente em condições de oscilações de calor e umidade, desidratação do ambiente em que estão (principalmente no ressecamento do capim) e tempo de estocagem de material. Além disso, as formas não-naturais são fotossensíveis e portanto, necessitam sempre de ambientes que as protejam da luz, como frascos de coloração âmbar (KING et al., 1967). Segundo Lucci (1997), a Vitamina E não apresenta formas de estocagem no organismo em quantidades suficientes, justificando a necessidade de fornecimento diário da mesma, principalmente através da alimentação.

Para a alimentação dos ruminantes, a forma natural pode ser encontrada, na maior parte das pastagens, independentemente da localização. Porém, depende do estágio vegetativo das forragens, sendo reduzida no período de estiagem, além de haver perda progressiva dos teores de Vitamina E em forragens conservadas, conforme o tempo de estocagem das mesmas, sendo este fenômeno muito comum na silagem de milho (LUCCI, 1997).

As formas não-naturais são: α -tocoferol acetato (Vitamina E acetato ou Vitamina E óleo) e α -tocoferol esterificado (Vitamina E álcool), ambas obtidas naturalmente de vegetais, porém com diferentes processos de produção. A forma Vitamina E álcool, apresenta moléculas menos estáveis e que resistem por pouco tempo assim que colocadas sob condições adversas. A forma Vitamina E acetato é considerada uma forma bastante estável (COELHO, 1991 e ALBERTS et al., 2002), sendo comercializada, em altas concentrações, como suplementos para animais em três diferentes formas: a) óleo para suplementação oral, b) soluções oleosas injetáveis e c) pó para diluição em água (COELHO, 1991). Esta última é considerada a de menor estabilidade entre as três opções, portanto menos utilizada comercialmente (ALBERTS et al., 2002).

As soluções injetáveis possuem maior eficiência na absorção quando injetadas por via intramuscular, além de apresentarem melhores resultados em

comparação com as soluções de suplementação oral. São muito utilizadas em diferentes dosagens principalmente em animais que apresentam sintomas de deficiência de Vitamina E (MACHLIN, 1984 e MCDOELL, 1992).

2.6.3 Funções

Segundo Coelho (1991) as principais funções da vitamina E são:

- Interação com o Selênio (Se) disponível no organismo animal;
- Função antioxidante.

2.6.3.1 Interação com Selênio

Para que a Vitamina E possa exercer todas as suas funções com maior eficiência, a mesma deve estar associada ao mineral Selênio (Se), pois a interação Vitamina E-Se aumenta a absorção dos dois compostos e otimiza as funções dos mesmos. Tal fato foi demonstrado no trabalho de Smith et al. (1984) em que vacas suplementadas com Vitamina E e Se apresentaram menor chance de desenvolvimento de mastite durante um maior período, em comparação com grupos de vacas suplementadas apenas com Vitamina E ou apenas com Se.

Porém o Se disponível nas pastagens utilizadas como alimentação para bovinos, diferentemente da Vitamina E, possui uma distribuição regional desigual. Exemplifica-se com os vegetais produzidos no Estado de São Paulo – Brasil, os quais possuem baixos teores de Se, devido ao empobrecimento do solo desta região em relação a determinados minerais. Portanto, nestes locais, a suplementação dos animais com Vitamina E somente surtiria efeitos desejáveis com a suplementação paralela com Se (LUCCI, 1997).

2.6.3.2 Função antioxidante

Junto ao Selênio, a Vitamina E torna-se capaz de exercer sua principal função, a de antioxidante. Esta vitamina age nos ambientes intracelulares e extracelulares, neutralizando todos os tipos de radicais livres e principalmente as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), originados do metabolismo celular (CHOW, 1979). A Vitamina E tem a capacidade de se ligar aos radicais livres e torna-los inativos, de forma que os mesmos não conseguem oxidar e degenerar componentes celulares, como membranas lipídicas (do núcleo e a membrana celular externa) (ENGESETH et al., 1993). Assim, ela protege as células do extravasamento de conteúdo nuclear e de conteúdo intracelular para o meio extracelular, prevenindo danos celulares e danos aos tecidos como um todo (NOCKELS, 1991).

Quando as células de defesa realizam a fagocitose de agentes invasores e iniciam a produção de EROs no interior dos fagossomos, a Vitamina E age protegendo os fagócitos da ação de suas próprias substâncias tóxicas contra seus componentes celulares. Desta forma, os neutrófilos e macrófagos estão parcialmente imunes aos radicais livres produzidos em seu interior e podem continuar o processo para matar as bactérias, por mais tempo e com maior intensidade, sem serem afetados. Por este motivo, a Vitamina E, quando presente, pode ser considerada responsável pelo aumento da função dos neutrófilos (BADWAY e FARNOVSKY, 1980).

Segundo Drouchner, (1976), a Vitamina E também pode agir junto à enzima Glutathione Peroxidase (GSH-px) destruindo, por meio de ligações moleculares, radicais livres de oxigênio formados a partir do processo de respiração celular nas mitocôndrias (fosforilação oxidativa).

Sintetizando diversos autores, esta função antioxidante tem como consequência a melhora do perfil imunológico dos bovinos (FINCH e TURNER, 1996; PEKMEZCI e CAKIROGLU, 2009), a diminuição de morbidade a determinadas doenças, o combate aos efeitos do estresse (produção de corticoides endógenos) e a manutenção de estruturas como músculos, sistema reprodutivo e glândula mamária (COELHO, 1991 e ALBERTS et al., 2002).

Segundo Higuchi et al., (2013), o transporte da Vitamina E no sangue de bezerros Holandeses é realizado pelo HDL (high-density lipoprotein), uma lipoproteína de alta densidade. Junto ao HDL a Vitamina E torna-se capaz de ser reconhecida pela superfície celular dos neutrófilos sanguíneos. Em seguida ocorre um rearranjo do citoesqueleto, que permite a captação da Vitamina E pelos neutrófilos e desta forma inicia-se a ação das mesmas dentro destas células.

A relação entre a Vitamina E e a imunidade dos bovinos tem sido tema de muitos estudos (LUCCI, 1997). Existem comprovações de que a Vitamina E, é capaz não somente de aumentar a função de células fagocíticas, mas também aumentar a atividade dos linfócitos T, além de estimular a produção de anticorpos, principalmente IgG, durante o desenvolvimento de resposta imunológica adaptativa contra determinados patógenos (COELHO, 1991). Por sua vez, Hogan et al. (1990), relataram que a suplementação com Vitamina E na dieta de bovinos aumentou a função dos neutrófilos em fagocitar e matar os agentes como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, *in vitro*.

Hogan (1999) afirma que, em humanos deficientes de Vitamina E e Selênio, os neutrófilos diminuem 70% do seu potencial de eliminação de bactérias. Da mesma forma, Gyang et al. (1984), afirmaram que células polimorfonucleares de bovinos aumentaram de forma significativa a função de bactericida, quando estes animais foram suplementados com Vitamina E e Se. Bednarek, Kondracki e Cakala (1996) comprovaram que a contagem total de leucócitos e a atividade fagocitária dos granulócitos aumenta em bezerros de 3 a 8 semanas de vida que receberam duas aplicações de α -tocoferol acetato injetável, por via intramuscular, com intervalo de duas semanas entre as aplicações, nas doses totais de 5,75 mg de Se e 75 mg de Vitamina E.

Trabalhos também apontam que a Vitamina E e Se, colaboram para a diminuição da infecção mamária de vacas leiteiras e aumentam a eficiência reprodutiva destes animais, evitando, principalmente, a retenção placentária, tudo isso devido a melhora imunológica (LUCCI, 1997). Grasso et al. (1990) afirmaram que vacas suplementadas com Vitamina E e Se apresentam menor risco de desenvolvimento de infecções da glândula mamária, devido ao fato de apresentarem células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, com atividade de fagocitose e morte de bactérias significativamente maior, quando

comparados a vacas com deficiência da Vitamina E e/ou do mineral. Os autores afirmaram, também, que o aumento das quantidades circulantes de Vitamina E diminui a ação dos radicais livres sobre diversos tecidos. Harrison, Hancock e Conrad (1984) atribuem a diminuição dos casos de infecções uterinas e retenção de placenta ao aumento da atividade neutrofílica em vacas suplementadas com Vitamina E e Se.

Segundo Lucci (1997), a deficiência de Vitamina E, reduz a fagocitose celular, a resposta imunitária e altera o metabolismo do ácido-arácônico, o qual, influencia na resposta inflamatória a infecções. Baixos teores sanguíneos e teciduais de Vitamina E, levam a uma menor eficiência de neutrófilos, pois a produção de substâncias tóxicas em seu interior, matam agentes invasores, porém atingem componentes celulares neutrofílicos de forma irreversível e podem levar a morte celular.

Por sua vez, com o desenvolvimento de afecções e estresse, os animais produzem glicocorticoides, epinefrina, eicosanoides, além de aumentar a atividade celular consumindo mais oxigênio, aumentando o metabolismo mitocondrial e produzindo mais radicais livres. Nestes casos a Vitamina E pode ser aplicada como tratamento nos animais afetados, pois estudos apontam que além de melhorar o estado imunológico, a Vitamina E também está associada a diminuição das quantidades de glicocorticoides endógenos atuando sobre seu potencial imunossupressor (GOLUB e GERSHWIN, 1985).

2.6.4 Recomendações de Vitamina E

A suplementação das vacas durante a gestação é de extrema importância, pois os bezerros neonatos possuem baixas taxas de Vitamina E em seus tecidos e dependem da vitamina contida no colostro para alcançar teores mínimos desejáveis e manter sua saúde (HIDIROGLOU; HOFFMAN e JENKINS 1969).

O colostro de vacas leiteiras pode chegar a ter 1,9 µg/mL de α -tocoferol no primeiro dia, podendo decair no leite à 0,3 µg/mL nos primeiros 30 dias de lactação, havendo necessidade de suplementação da vaca ou do bezerro

(HIDIROGLOU, 1989). Singh et al. (2013) relata que a suplementação, de búfalas gestantes, com Vitamina E, melhora a viabilidade dos bezerros bubalinos. Mokhber-Dezfouli et al. (2008), sugere que a aplicação intramuscular de uma única dose de Vitamina E injetável, é a melhor forma de proteger os bezerros neonatos dos efeitos causados pelo estresse nas primeiras semanas de vida.

A quantificação dos teores de Vitamina E no sangue pode ser realizada por espectrofotometria, utilizando-se o plasma, porém Roquet; Nockels e Papas (2014) sugerem que a utilização das hemácias para esta determinação pode ser mais eficiente. Segundo Lucci, (1997), foram encontrados bovinos com sintomas de deficiência de Vitamina E, apresentando taxas séricas de 0,34 mg/100 mL e 0,5 mg/L da mesma. Hidiroglou; Lessord e Wauthy (1978) relataram taxas séricas de Vitamina E em bezerros saudáveis variando de 114 µg/mL à 194 µg/mL.

Hidiroglou; Batra e Zhao. (1995), verificaram que a suplementação com Vitamina E, não traz efeitos nocivos aos neutrófilos de bovinos da raça holandesa. Coelho, (1991), considera a suplementação mínima ideal de Vitamina E, para manutenção de funções fisiológicas, 1 a 2 mg/kg de peso vivo, diariamente, por via oral, desde que não haja deficiência de Se.

Por sua vez, a utilização de alimentos concentrados na alimentação de vacas, no período pós-parto, pode aumentar a acidez ruminal, fato que acentua a degradação de Vitamina E do alimento ingerido, devido à sensibilidade das moléculas de tocoferóis. Esta perda de Vitamina E, resulta em menor absorção da mesma pelo intestino, portanto menor concentração desta vitamina no leite e colostro produzido por estes animais, fato que pode acarretar deficiência de Vitamina E nos bezerros lactentes, não suplementados de forma adequada, principalmente nas primeiras semanas de vida (LUCCI, 1997). Maas et al. (2008), reforçaram que o leite materno é a principal fonte de Vitamina E para os bezerros neonatos. Roquet; Nockels e Papas (2014) afirmaram que em condições normais de acidez ruminal, a digestão pré intestinal das moléculas de Vitamina E pode auxiliar na absorção intestinal da mesma. Recomenda-se a suplementação das vacas gestantes, 30 dias antes do parto, na dose de 100 a 200 UI/kg para se evitar baixos teores de Vitamina E no leite e para que o mesmo auxilie na imunidade da mãe, evitando a retenção de placenta e infecções

uterinas e mamárias. Esta suplementação também auxilia no crescimento final do feto (HOFFMANN – LA ROCHE, 1991).

O Quadro 1 demonstra, em resumo, algumas das dosagens de Vitamina E descritas na literatura e suas respectivas justificativas.

Quadro 1 - Dosagens de Vitamina E e justificativas descritas na literatura

continua

Doses	Justificativas	Autores
30 UI/kg	Ação da Vitamina E sobre os linfócitos em diferentes tecidos do corpo de bezerros da raça Wagyu	Haga et al. (2015)
25 UI/kg	Interação com neutrófilos sanguíneos de bezerros da raça Holandesa.	Higuchi et al. (2013)
300 UI/kg	Aumento da contagem total de Leucócitos de bezerros da raça Wagyu e consequente melhoria da imunidade.	Otomaru et al. (2015)
300 UI/kg	Aumenta a produção de anticorpos, após vacinação contra Herpes Vírus Bovino 1, em bezerros Wagyu	Otomaru et al. (2013)
400 a 600 mg/animal	Aumento da função de neutrófilos de vacas leiteiras em período seco e início de lactação	Hogan et al. (1990)
125 – 250 UI/animal	Melhoras performance de funções fisiológicas de bezerros	Roquet, Nockels e Papas (2014)
1 – 2 UI/kg	Manutenção de funções fisiológicas de bovinos	Coelho (1991)
100 – 200 UI/kg	Auxilia na gestação e imunidade da vaca gestante Holandesa.	Hoffmann – La Roche (1991)
2.000 UI/kg	Dosagem máxima tolerável, em única aplicação, sem efeitos tóxicos para humanos.	NRC (1987)
75 mg/animal	Melhora a contagem total de leucócitos e a função de granulócitos de bezerros Holandeses	Bednarek, Kondracki e Cakala (1996)
125 a 250 UI/bezerro	Melhoras performance de funções fisiológicas de bezerros	Reddy et al. (1985)

(continuação)

Doses	Justificativas	Autores
500 UI/bezerro	Melhora de função imunológica contra infecções de bezerros	Reddy et al. (1987)
80 a 120 mg/100Kg	Melhora das funções fisiológicas de bezerros	Aberts et al. (2002)
150 a 200 mg/100Kg	Melhora de função imunológica de bezerros	Aberts et al. (2002)
100 a 150 mg/100Kg	Melhora das funções fisiológicas de novilhas	Aberts et al. (2002)
200 a 300 mg/100Kg	Melhora das funções fisiológicas de bovinos de corte	Aberts et al. (2002)
200 a 400 mg/100Kg	Melhora das funções fisiológicas de bovinos de corte	Aberts et al. (2002)
1.000 a 1.500 mg/100Kg	Melhora a qualidade da carne de bovinos de corte e diminui a incidência de afecções mamárias durante o período seco e as dez primeiras semanas de lactação de vacas leiteiras.	Aberts et al. (2002)
140 a 700 UI/animal	Diminuição da incidência de retenção placentária nas vacas	Eger et al. (1985)
1.000 UI/animal	Diminuição da incidência de infecções uterinas e retenção placentária nas vacas	Harrison, Hancock e Conrad (1984)
680 UI/vaca gestante	Melhora da saúde dos bezerros ao nascimento e menor incidência de retenção placentária das vacas	Daniels, Kellogg e Harrison (1987)

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

2.6.5 Efeitos da deficiência ou hipervitaminose E

2.6.5.1 Deficiência de Vitamina E

A deficiência de Vitamina E e Se ocorre em neonatos ruminantes (bovinos, ovinos, antílopes, bubalinos, camelos e cangurus) e causa degeneração e distrofia de musculatura esquelética e cardíaca nestes animais. Esta enfermidade é denominada Doença do Músculo Branco (DMB), devido aos feixes musculares apresentarem estrias brancas e necrose muscular, grosseiramente visíveis durante a necropsia (SMITH, 1970). Esta degeneração muscular é causada pela ação de radicais livres sobre as membranas dos miócitos, levando a um extravasamento de conteúdo intracelular para o meio extracelular e para o sangue, permitindo que o diagnóstico da doença seja realizado a partir da mensuração de enzimas, presentes no sangue, provenientes dos miócitos lesados, como aspartato amino transferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), creatina fosfoquinase (CK), malato desidrogenase (MDH) e glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) (TOLLERSRUD, 1973).

Os bezerros afetados de forma aguda, geralmente apresentam fraqueza muscular generalizada, rigidez e miodegeneração, ataxia, dificuldade para se manter em estação e para realizar movimentos de sucção durante a mamada (MUTH, 1955). Também podem ser observadas alterações cardíacas durante o exame físico, devido à degeneração do miocárdio. Situações estressantes podem ajudar a desencadear a doença. Nos casos crônicos, podem ser encontrados: degeneração intensa do miocárdio, ataxia acentuada, enrijecimento muscular intenso em membros, pescoço e região lombar e tremor muscular generalizado (NRC, 1984).

Em bovinos adultos os sintomas da deficiência de Vitamina E e Se manifestam-se com menor frequência e podem ser imperceptíveis, porém alguns autores descreveram casos de miopatia degenerativa em animais adultos. Foram relatados casos de novilhas que apresentaram abortamentos, decúbito permanente durante a gestação e partos de bezerros natimortos, sendo revelada a miodegeneração e deficiência de Vitamina E através da necropsia e análise de

tecidos coletados dos animais (HUTCHINSON; SCHOLZ e DRAKE, 1982). Também os autores Barton e Allen (1973) encontraram bovinos adultos, apresentando miopatia em locais onde o pasto recebia tratamento com ácido propiônico, conhecido por destruir moléculas de Vitamina E.

O tratamento para os casos de deficiência de Vitamina E é a utilização de α -tocoferol acetato injetável em diferentes doses, de acordo com a necessidade, variando de acordo com a literatura utilizada (NRC, 1984).

2.6.5.2 Hipervitaminose E

Alguns casos de hipervitaminose têm sido descritos por alguns autores em relação as Vitaminas A e D. Acredita-se que o excesso de Vitamina E pode trazer efeitos indesejáveis, porém nunca foram descritos em bovinos. Considera-se, para ratos, pintainhos e humanos, a dose máxima tolerável, sem efeitos tóxicos, de 2.000 UI/kg (NRC, 1987).

3 OBJETIVO

Avaliar a influência da suplementação com Vitamina E injetável na função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu nos primeiros 60 dias de vida.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência da suplementação com Vitamina E injetável na fagocitose de *Staphylococcus aureus* pelos neutrófilos de bezerros da raça Wagyu nos primeiros 60 dias de vida.

Avaliar a influência da suplementação com Vitamina E injetável na produção de EROs pelos neutrófilos de bezerros da raça Wagyu nos primeiros 60 dias de vida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E MANEJO DA PROPRIEDADE

Foram selecionados 26 bezerros hígidos da raça Wagyu, com idade entre 2 e 10 dias, de um mesmo lote e de uma mesma propriedade na região de Bragança Paulista, no Estado de São Paulo, Brasil (Latitude 22°57'07"S e Longitude 46°32'31"W aproximadas da região). Todos os bezerros provêm de Inseminação Artificial de vacas da Raça Wagyu, por sêmen de touros da mesma raça. A propriedade possui área de 200 hectares (ha), sendo 18 ha destinados a pastos, para produção de leite com bovinos da raça Holandês Preto e Branco e 80 ha destinados à produção de bovinos de corte da Raça Wagyu. Outros 65 ha são utilizados para produção de silagem.

No primeiro dia de vida de todos os bezerros da propriedade, foi realizada a limpeza e desinfecção do umbigo com a utilização do produto comercial (Umbicura®, Diclorvos, Pecuarista D'Oeste, Brasil), o qual possui iodofórmio em sua composição. Os animais também foram identificados com brincos e tatuagens na face interna do pavilhão auricular.

Durante o experimento, os bezerros foram acompanhados desde a primeira semana até completarem 60 dias de vida, sendo que, até os 30 dias de vida, os bezerros permaneceram junto as suas mães, em tempo integral. No período, ficaram em piquetes com capim-mombaça (*Megathyrsus maximus*), onde receberam o colostro e o leite, de forma natural. Os bezerros, a partir de 30 dias de vida até os oito meses de idade, receberam um manejo diferenciado na propriedade, sendo separados das mães no período da manhã e colocados em piquete, onde receberam alimentação diferenciada em cocho, contendo ração concentrada, em quantidade equivalente a 1% do peso vivo/dia. Durante

os períodos vespertino e noturno, retornavam ao piquete onde permaneceram junto às mães para amamentação, além de possuírem também acesso a bebedouro com água, para hidratação. O piquete utilizado pela manhã, para a suplementação alimentar dos bezerros, permanecia vazio durante os períodos da tarde e noite, sob incidência solar.

Figura 2 – Bezerros da raça Wagyu, selecionados para o experimento.

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Os 26 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 13 animais, denominados Grupo Controle e Grupo Vitamina E.

O Grupo Vitamina E recebeu uma única aplicação de Vitamina E (Monovin E®, acetato de α -tocoferol, BRAVET, Brasil), por via intramuscular, de 30 UI/kg (mg/kg). Esta dose foi adaptada de Haga et al. (2015). O Grupo Controle recebeu uma aplicação intramuscular de solução de NaCl 0,9% no mesmo volume correspondente ao da preparação de Vitamina E, de acordo com o peso do animal. Os animais de ambos os grupos receberam, na primeira semana de vida, apenas uma única aplicação intramuscular, no músculo semimembranoso, com

a utilização de agulha 40 mm x 12 mm e seringa de 20 mL. Para tanto, foi realizada, previamente, antissepsia do local com algodão embebido em álcool 70%, friccionado sobre a pele do animal, no local da aplicação. O volume de Vitamina E, foi dividido em duas partes e aplicado na mesma região dos dois membros pélvicos, para diminuir o incômodo durante a aplicação.

4.3 COLHEITAS DE DADOS E AMOSTRAS

As colheitas de sangue e de dados foram realizadas semanalmente, em oito momentos diferentes, com intervalos de sete dias entre cada coleta, desde a primeira semana de vida dos animais, até que os mesmos completassem 60 dias de vida. A primeira coleta foi realizada uma hora antes da aplicação de Vitamina E ou de Solução de NaCl 0,9% nos dois Grupos. Os oito momentos foram denominados: M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 e M8. A média de idade dos animais em cada um dos momentos está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Idade média dos animais em cada momento de avaliação (de M1 à M8)

Momentos	Idades (dias)
M1	7,35 ($\pm 2,64$)
M2	14,35 ($\pm 2,64$)
M3	21,35 ($\pm 2,64$)
M4	28,35 ($\pm 2,64$)
M5	35,35 ($\pm 2,64$)
M6	42,35 ($\pm 2,64$)
M7	49,35 ($\pm 2,64$)
M8	56,35 ($\pm 2,64$)

Fonte: WEISS E. C.

Todos os bezerros foram avaliados com exames físicos conforme estabelecido por Dirksen, Gründer e Stöber (1993) e Feitosa e Benesi (2014), incluindo a avaliação do estado geral dos animais e funções vitais como frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto) e temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$), além do estado

de hidratação (turgor de pele, em segundos) e coloração das mucosas aparentes.

Foi realizada a pesagem dos animais, com a Fita de pesagem (Fita peso para bovinos leiteiros, MSD®, Brasil), padronizada para bovinos da raça Holandesa, que, portanto, pode gerar divergências entre o peso real dos animais (em kg) e o resultado de pesagem com a fita. Não foi possível pesar os animais com a utilização de balança. O ganho de peso foi estabelecido por meio da subtração do resultado da pesagem do momento avaliado, daquele obtido no momento anterior. Foram realizadas também, colheitas de sangue através da punção da veia jugular na região cervical, com pré-higienização da região com álcool 70% e utilizando agulhas 25 mm x 8 mm, em 3 tubos com sistema de vácuo (Vacutainer®, BD, Brasil). Em cada coleta, para cada animal, foi utilizado um tubo de 2 mL com solução de EDTA tripotássico na proporção de 1,5 mg/mL, um tubo de 2 mL com gel SST ativador de coagulação e um tubo de 5 mL com solução de Heparina sódica. Os dados de cada animal foram registrados em uma ficha padrão individual em que constaram os dados obtidos no exame físico, assim como algumas informações da propriedade. Após a coleta, todos os tubos foram armazenados em caixa térmica com gelo, mantendo-se temperatura de aproximadamente 4°C e transportados até o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O sangue dos tubos com gel SST, após a coagulação, foi submetido à centrifugação, a 1.800 x g por 15 minutos para, posteriormente, o soro sanguíneo obtido, ser dividido em alíquotas de 1 mL e armazenado a -20° C. Este material foi utilizado para avaliação bioquímica, que incluiu a mensuração de componentes sorológicos, para determinação de transferência de imunidade passiva, além de acompanhamento do estado fisiológico dos animais.

O sangue nos tubos contendo anticoagulante EDTA, ao chegarem ao laboratório, foram imediatamente processados para avaliação do hemograma, mensuração do fibrinogênio e da proteína plasmática total. Por sua vez, os tubos contendo o anticoagulante Heparina sódica foram colocados em geladeira, a temperatura de aproximadamente 4°C, para serem utilizados no preparo das amostras para a análise por citometria de fluxo, em até 24 horas após a coleta.

4.4 EXAMES LABORATORIAIS

4.4.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em contador eletrônico de partículas (Mindray® BC-2800Vet, Auto Hematology Analyser, 2005-2007 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen, China), após prévia calibração do equipamento conforme a espécie e categoria animal (bovinos jovens/bezerros). Foram realizadas as contagens de eritrócitos e de leucócitos, a dosagem de hemoglobina e calculados os índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM) além da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) e a contagem total de Plaquetas. O volume globular (VG) foi determinado pela microtécnica de avaliação do hematócrito, segundo a padronização estabelecida por Birgel (1982). Uma alíquota desse sangue foi utilizada para confecção de esfregaços sanguíneos, posteriormente corados pelo método de Rosenfeld (1947), para a realização da contagem diferencial de leucócitos, segundo critérios propostos por Birgel (1982). As referências dos valores para o hemograma foram baseadas nos valores para bezerros com até 30 dias de vida, determinados por Benesi et al. (2012a e 2012b), além dos descritos em Adams et al. (1992), Radostits et al. (2002) e outros autores.

4.4.2 Identificação da Transferência de imunidade passiva (TIP)

A TIP foi verificada pela análise de concentrações de substâncias com alta correlação com os teores sérico de imunoglobulinas, a saber: Proteína sérica total, concentração sérica de globulinas, relação albumina:globulina (relação A:G) e atividade enzimática da gama glutamiltransferase (GGT). A qualidade da TIP dos bezerros foi avaliada por meio dos resultados obtidos nessas provas e de acordo com o valor padrão de corte usado para cada uma das determinações bioquímicas. O critério para classificação dos animais como tendo adequada TIP

considerou aqueles que apresentaram pelo menos valores de dois parâmetros (SEINO, 2014) dentro do intervalo de normalidade dos valores descritos na literatura, para cada uma das avaliações.

Estas mesmas substâncias continuaram a ser mensuradas até que os animais completassem 60 dias de vida, para que fosse possível observar o comportamento de variação destes valores ao longo do tempo e avaliar o estado geral de saúde dos animais, incluindo também a avaliação dos valores de fibrinogênio.

4.4.2.1 Proteína Sérica Total (PST), Globulinas, GGT e relação albumina:globulina (A:G)

As concentrações séricas de Proteína total (PST), albumina e atividade enzimática da gama glutamiltransferase (GGT), foram mensurados por meio do analisador bioquímico Randox® (RX Daytona™3901, Randox Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, Reino Unido) no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo.

Seguindo-se Weaver et al. (2000) e Tyler et al. (1999), o valor limite de PST de 5,5 g/dL foi estabelecido para a classificação dos bezerros como tendo TIP adequada.

Os valores das globulinas foram calculados por meio da diferença da PST e a concentração de albumina. Por fim, foi estabelecida a razão entre as duas variáveis: albumina e globulina. Seguiu-se o recomendado por Feitosa et al. (2001), em que o valor mínimo para globulinas deve ser de 2,19 g/dL para bezerros com TIP adequada. Estes autores destacaram que abaixo desses valores, foi observado óbito de um maior número de bezerros, em relação aos que apresentaram valores séricos mais altos de globulina.

Por sua vez, adotou-se a relação A:G dos bezerros com TIP adequada quando acima de 0,98 segundo o observado por Vettorato et al. (2012), que identificaram, em animais com falha na transferência de imunidade passiva (FTIP), relações maiores que 0,98, após 15 dias de vida.

Para a avaliação dos resultados da atividade enzimática da GGT, adotou-se os critérios de Parish et al., (1997). Segundo estes autores, os valores mínimos de GGT para classificar os bezerros com TIP, variam de acordo com a idade, do animal, sendo: 200UI/L para bezerros com 1 dia, 100UI/L para aqueles de 2 a 4 dias, 75UI/L para aqueles de 5 a 7 dias e 50UI/L para aqueles com 8-10 dias de idade.

4.4.3 Fibrinogênio

Para mensurar os valores de fibrinogênio de cada amostra, foi utilizado o método de precipitação pelo calor, descrito por Stockham e Scott (2011). O sangue contendo EDTA foi colocado em microtubos de vidro (dois microtubos para cada amostra) e centrifugado em centrífuga de microhematócrito, por cinco minutos. Então, o primeiro microtubo foi utilizado para determinação da concentração de proteína plasmática total no refratômetro (com aproximação ou arredondamento de 0,1 g/dL). Realizou-se a prévia calibragem do refratômetro, utilizando-se 0,5mL de água destilada, com o cuidado de que após este procedimento, o equipamento permanecesse limpo e seco.

Por sua vez, o segundo microtubo foi colocado em banho maria à temperatura de 56 a 58°C por 3 minutos. Em seguida, ele foi novamente centrifugado, por tempo mínimo de 1 minuto, para compactação do fibrinogênio precipitado. Então, os microtubos foram removidos e quebrados para a remoção do plasma. Foi colocada uma gota do sobrenadante sobre o refratômetro e realizada a leitura da concentração de proteína plasmática total (também com aproximação ou arredondamento de 0,1 g/dL).

O cálculo final do fibrinogênio foi obtido subtraindo-se o resultado da leitura do segundo capilar, do resultado do primeiro capilar ([fibrinogênio] estimada = [Ppt] do primeiro capilar - [Ppt] do segundo capilar).

Foram tomados como valores de referência para a concentração plasmática de fibrinogênio dos bovinos os descritos em Radostits (2002), de 200 a 700 mg/dL.

4.4.4 Produção intracelular de Peróxido de Hidrogênio

4.4.4.1 Preparo das amostras

O protocolo utilizado para o preparo das amostras foi adaptado daquele descrito por Azedo (2007).

Os reagentes e soluções utilizadas estão descritos no item 4.4.4.3.

Foram utilizadas as amostras de sangue dos tubos contendo heparina, os quais foram mantidos previamente à temperatura de 4°C, por aproximadamente 24 horas. Os tubos foram identificados como A “Pool”, B “Pool”, D “Pool”, B e C, todos com a devida identificação. Para cada amostra de sangue de cada animal foi utilizado um tubo B e um C. Por sua vez, os tubos A “Pool”, B “Pool” e D “Pool” continham amostras de sangue de todos os animais. Portanto, em cada data de preparação das amostras (8 preparações, sendo uma preparação para cada momento, de M1 à M8), foram confeccionados 26 tubos B, 26 tubos C, e apenas um tubo A “Pool”, um tubo B “Pool” e um tubo D “Pool”.

Em cada um dos tubos foi colocado 1000 µL de solução de PBS USO (descrito à frente no item 4.4.4.3). Aos tubos B e C de cada animal foram adicionados 100 µL de amostra de sangue em seu tubo correspondente. Nos tubos A “Pool”, B “Pool” e D “Pool” foram adicionados 3,9 µL de sangue de cada um dos 26 animais, para que, ao final, completasse um total de 100 µL de sangue em cada tubo. Em cada tubo C e no tubo D “Pool” foram adicionados, também, 100 µL de *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SaPI). Em cada um dos tubos B, C e B “Pool”, foram adicionados, ainda, 200 µL de solução DCFH-DA USO. A composição inicial de cada tubo está descrita no Quadro 2.

Quadro 2 - Composição de cada um dos tubos durante a preparação das amostras para análise por Citometria de fluxo

Componentes	Tubo A Pool	Tubo B Pool	Tubo D Pool	Tubo B de cada animal	Tubo C de cada animal
PBS uso	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Sangue heparinizado	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
DCFH-DA	-	200 µL	-	200 µL	200 µL
SaPI	-	-	100 µL	-	100 µL

Fonte: WEISS E. C. (2017)

Após a adição das substâncias, os tubos foram incubados em banho maria a 37°C por 30 minutos, sob ligeira agitação. Em seguida, os tubos foram retirados do banho maria e foram adicionados 2 mL de solução de EDTA a 3 mM, a 4°C, nos tubos C e D “Pool”, para cessar a reação e retirar as SaPI, não fagocitadas, aderidas às paredes dos neutrófilos. Nos tubos A “Pool”, B “Pool” e B foram adicionados 2 mL de solução de PBS USO. Após todos os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada, a 4°C por 10 minutos a uma velocidade de 280 x *g*.

Para a lise dos eritrócitos, após se desprezar o sobrenadante, foi adicionado em cada tubo, 2 mL de solução de NaCl a 0,2% e esperados 30 segundos. A seguir, adicionou-se 2 mL de solução de NaCl a 1,6%, para recomposição da solução fisiológica. Em seguida os tubos foram centrifugados novamente a 4°C, à velocidade de 280 x *G*, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o procedimento para lise eritrocitária foi repetido por mais duas vezes, até que se obtivesse uma solução translúcida. Somente então, foi adicionado 300 µL de solução de PBS USO a 4°C e todos os tubos foram levados imediatamente para a avaliação por citometria de fluxo.

4.4.4.2 Avaliação da produção de Peróxido de Hidrogênio por citometria de fluxo

As amostras foram levadas ao Laboratório de Técnicas imunológicas aplicadas à morfofisiologia (LTIAM) do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para serem analisadas no Citômetro de Fluxo FACSCalibur® (Becton Dickison Immunocytometry System™, San Diego, CA).

Foram adquiridos dez mil eventos e os tipos celulares foram avaliados quanto ao seu tamanho (em FSC) e sua complexidade celular interna (em SSC), sendo esta aquisição realizada através do programa Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry System™, San Diego, CA).

A análise das fluorescências emitidas foi realizada utilizando-se “software FlowJo®” Versão 7.1.3. (Tree Star™, Inc., Ashland, OR). Inicialmente, selecionou-se a população de granulócitos de acordo com tamanho (detectado em FSC) e complexidade celular (detectada em SSC) compatíveis com granulócitos, como descrito em Azedo (2007) (Figura 3). Em seguida, a produção de H₂O₂ basal e determinação do limite para a fluorescência captada pelo detector FL1 foi avaliada nos tubos onde foram adicionados células e o substrato DCFH-DA. Os próximos tubos da análise eram os que continham apenas as células e SaPI, para a determinação do limite da fluorescência captada pelo detector FL3.

Figura 3 – Citograma demonstrando a seleção da população de granulócitos (gate) em meio aos leucócitos, de acordo com o tamanho (detectado em FSC) e com a complexidade celular (detectada em SSC)

Fonte: (WEISS E. C., 2017)

Por fim, após ter sido realizada esta calibração, a partir dos controles (tubos A “Pool”, B “Pool” e D “Pool”), procedeu-se às análises dos ensaios que continham DCFH-DA e os que continham, também, SaPI (tubos B e C, respectivamente). Nestes tubos, foram analisadas as porcentagens de células emitindo as fluorescências captadas pelos detectores FL1 e FL3, para a determinação da fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio com (tubos C) ou sem (tubos B) estímulo pela fagocitose de SaPI.

Por meio da intensidade média da fluorescência emitida pelo DCF (captada pelo detector FL1) ou pelo iodeto de propídio (captada pelo detector FL3) pode-se estimar, também, a intensidade de produção de EROS e da fagocitose de SaPI, respectivamente. Através desta análise, foi possível dividir os granulócitos em quatro subpopulações denominadas Q1, Q2, Q3 e Q4 (Figura 4). Sendo:

- **Q1:** Células que fagocitaram SaPI, mas não produziram EROS: **EROS(-) e SaPI(+)**
- **Q2:** Células que fagocitaram SaPI e produziram EROS: **EROS(+) e SaPI(+)**
- **Q3:** Células que não fagocitaram SaPI e não produziram EROS: **EROS(-) e SaPI(-)**
- **Q4:** Células que não fagocitaram SaPI mas, produziram EROS: **EROS(+) e SaPI(-)**

Figura 4 – Dot plot demonstrando a divisão dos granulócitos em quatro subpopulações Q1, Q2, Q3 e Q4, de acordo com a análise de FL1 e FL3

Fonte: (WEISS E. C. 2017)

Legenda: Q1: EROS(-) e SaPI(+), Q2: EROS(+) e SaPI(+), Q3: EROS(-) e SaPI(-) e Q4: EROS(+) e SaPI(-)

4.4.4.3 Reagentes utilizados e preparação das soluções

4.4.4.3.1 PBS Solução mãe

Para a produção de Solução de PBS concentrado, chamada de Solução PBS mãe, foi utilizado 1000 mL de H₂O milli Q e adicionado 14,2 g de Na₂HPO₄ anidro, 3,6 g de NaH₂PO₄ H₂O e 82 g de NaCl.

4.4.4.3.2 PBS uso

A solução de PBS utilizada na preparação das amostras para a produção intracelular de H₂O₂, foi chamada de Solução de PBS uso. Esta foi obtida através da diluição da Solução de PBS mãe em Água milli Q, na proporção de 1:9, ou seja, 100 mL PBS mãe diluídos em 900 mL de H₂O milli Q. Obtendo-se pH da solução final entre 7,2 a 7,4, mensurado no pHmetro.

4.4.4.3.3 EDTA dissódico (3mM)

Para obtenção da Solução de EDTA, foi necessário diluir 0,1116 g de EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_{22}H_2O$ PM 372,24 g/mol) em 100 mL de PBS uso.

4.4.4.3.4 Soluções de NaCl 0,2% e 1,6%

Para obtenção da solução de NaCl 0,2% foi preciso diluir 0,2 g de NaCl em 100 mL de H₂O milli Q. A diluição de 1,6 g de NaCl em 100 ml de H₂O milli Q resultou na obtenção de solução de NaCl a 1,6%.

4.4.4.3.5 Solução de estoque (mãe) de DCFH-DA – 25 mM

Para obter-se a solução de DCFH para estoque (Solução mãe) foi adicionado 24,35 mg de DCFH pó comercial a 2 mL de Etanol. A mesma foi mantida à uma temperatura de -20°C, em recipiente âmbar, devido à fotossensibilidade.

4.4.4.3.6 Solução de uso de DCFH-DA.

A solução de DCFH utilizada para o preparo das amostras foi chamada de Solução de DCFH uso, obtida a partir da diluição de 100 µL de solução de DCFH mãe em 8,2 mL de PBS uso. A diluição foi feita imediatamente antes do uso.

4.4.4.3.7 Solução tampão de Carbonato 0,1 M

A solução tampão de Carbonato a 0,1 M e pH 9,6 foi feita a partir de 80 mL de solução de Na_2CO_3 a 0,2 M acrescido de 170 mL de solução de NaHCO_3 a 0,2 M e 250 mL de H_2O destilada.

4.4.4.3.8 *Staphylococcus aureus* conjugado com Iodeto de Propídeo (SaPI)

Para a produção de SaPI foi preparada primeiramente a solução estoque de Iodeto de Propídio (PI) a 10 mg/mL, que foi diluída em solução tampão de Carbonato até chegar à concentração final da solução de PI à 100 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida foi realizada a mistura de 10 mL da solução de PI à 100 $\mu\text{g/mL}$ com igual quantidade de Solução Pansorbin Cells® Novabiochem AS, Comercial. Depois deste procedimento, esta solução foi mantida à temperatura de 4°C, sob leve agitação e proteção de luminosidade, por um período de 24 horas e então, foi centrifugada a 16.000 x g, por 30 segundos. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se quantidade semelhante de PBS uso e o mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo que, na última vez, após se desprezar o sobrenadante, a solução foi ressuspensa com igual proporção de solução de PBS uso e aliquoteada para ser estocada à temperatura de -20°C, protegida da luminosidade, até seu uso, no preparo das amostras para a citometria de fluxo.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após o registro em planilhas, os dados foram analisados com o “software” estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

As análises descritivas são apresentadas pela média e desvio padrão para variáveis com distribuição normal e mediana e Intervalo Interquartil (IIQ) para as restantes.

Para a comparação entre os grupos (Vitamina E e Controle) foram utilizados o Teste “T” de Student para as variáveis que apresentaram distribuição normal e o teste de Mann Whitney para as demais. Para a comparação entre os tempos dentro do mesmo grupo (M1 a M8), a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi aplicada para as variáveis que atenderam os pressupostos de normalidade e esfericidade, enquanto o teste de Friedman foi aplicado para as demais, sendo utilizado o teste de Wilcoxon para a análise post-hoc.

Em todas as análises o nível de significância (α) utilizado foi de 5%. Isso implica que para as análises com múltiplas comparações bivariadas, foi aceito para cada uma das comparações um valor de $\alpha = 0,05 / m$, onde m é o número de comparações.

Para as comparações entre grupos (Grupo Controle e Grupo Vitamina E) considerou-se diferença quando $p < 0,0062$ (que significa o valor de p , de 0,05, dividido por 8 comparações). Para as comparações ao longo do tempo (entre os diferentes momentos), considerando os dois grupos com $n=13$ em cada um, caracterizou-se diferença quando $p < 0,0017$ (que significa o valor de p , de 0,05, dividido por 28 comparações).

Para todos os parâmetros, as comparações entre os diferentes momentos também foram realizadas considerando todos os animais avaliados, sem divisões entre grupos ($n=26$), devido à ausência de diferença entre os grupos Controle e Vitamina E, durante todo o período avaliado. Para esta análise também se considerou diferença quando $p < 0,0017$ (que significa o valor de p , de 0,05, dividido por 28 comparações).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 26 bezerros da raça Wagyu, sendo este total, distribuído em dois grupos: Controle e Vitamina E. Realizou-se comparações entre os dois

grupos com avaliação dos mesmos ao longo do período de estudo (de M1 a M8) e avaliação de todos os animais em conjunto (n=26).

5.1 EXAME FÍSICO

A avaliação por meio do exame físico foi utilizada para o acompanhamento do estado de higidez dos animais durante o experimento. Assim, todos os animais foram considerados saudáveis durante o período da pesquisa (de M1 a M8), considerados os seguintes parâmetros: ganho de peso, funções vitais (temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória), estado de hidratação (turgor de pele) e mucosas aparêntes.

As tabelas 16 e 17 com os dados obtidos para a temperatura retal, a frequência cardíaca, a frequência respiratória e turgor de pele, constam no Apêndice. A coloração das mucosas dos animais foi classificada como rósea em todas as avaliações.

5.1.1 Ganho de peso (kg)

Durante os primeiros 60 dias de vida, os bezerros Wagyu apresentaram ganho de peso constante, sem diferenças entre os momentos, na avaliação dos dois grupos e do conjunto de 26 animais, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Valores de Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) do Ganho de peso dos animais em quilogramas (kg), dos grupos Vitamina E e Controle em cada momento

Momento	Grupo Vitamina E (kg)	Grupo Controle (kg)
M2	3 (± 5)	1 (± 4)
M3	2 (± 4)	6 (± 5)
M4	4 (± 10)	4 (± 5)
M5	2 (± 6)	0 (± 3)
M6	2 (± 5)	0 (± 4)
M7	2 (± 6)	2 (± 5)
M8	4 (± 7)	4 (± 6)

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Considerando a idade média dos animais, em dias, em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35.

Tabela 3 - Valores de mediana e Intervalo interquartil (IIQ) do Ganho de peso de todos animais em quilogramas (kg), em cada momento

Momento	26 animais
M2	2 (± 5)
M3	4 (± 5)
M4	4 (± 7)
M5	0 (± 4)
M6	2 (± 4)
M7	2 (± 6)
M8	4 (± 6)

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35.

Segundo Rocha et al. (2013), o ganho de peso de animais jovens constitui uma importante forma de verificação do estado de saúde, pois a ocorrência de enfermidades é um impediente ao desempenho positivo deste parâmetro de avaliação, principalmente pela redução na ingestão de alimentos ou pelas perdas ocasionadas por diarreia e doenças respiratórias, comuns em bezerros neonatos.

O ganho de peso dos bezerros Wagyu avaliados manteve-se constante, permitindo deduzir que os animais mantiveram seu metabolismo de modo adequado durante o período de avaliação. Estes dados diferem daqueles

trabalhos como o de Rocha et al. (2013), em que o ganho de peso dos bezerros da raça Canchim e Nelore apresenta diferenças desde o nascimento até os primeiros 30 dias de idade, período em que há um aumento no ganho de peso.

Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, a suplementação de Vitamina E em bezerros neonatos também não apresentou alterações no crescimento dos bezerros no estudo de Swecker et al. (2008).

É necessário ressaltar que a pesagem dos animais foi realizada com uso de Fita de pesagem (Fita peso para bovinos leiteiros, MSD®, Brasil), padronizada para bovinos da raça Holandesa. Portanto, pode gerar divergências entre o peso real dos animais (em kg) e o resultado de pesagem com a fita. A não utilização de balança para a pesagem dos animais, pode ter sido um fator significativo de influência sobre os resultados do ganho de peso.

5.2 EXAMES LABORATORIAIS

5.2.1 Eritrograma

A análise descritiva dos resultados do eritrograma foi realizada para os dados que apresentaram distribuição normal: Hemoglobina (Hb) (g/dL), Hematócrito (Ht) (%), Volume corpuscular médio (VCM) (fL), Hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL). Bem como para os seguintes dados, que não apresentaram distribuição normal: Contagens total eritrocitária (Hemácias) ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (ADE ou RDW) (%).

Os resultados obtidos no eritrograma dos animais em função dos grupos Controle e Vitamina E, avaliados ao longo do tempo (de M1 a M8), estão descritos na Tabela 4. Enquanto os valores de eritrograma do conjunto de todos os animais ($n=26$) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4 - Valores dos componentes do Eritrograma dos animais dos grupos Controle (Cont) n=13 e Vitamina E (Vit E) n=13, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Hemácias, ADE (ou RDW) e Plaquetas, e Média e Desvio padrão (DP) para os demais parâmetros

Momentos	Hemácias(x10 ⁶ /μL)		Hemoglobina(g/dL)		VG(%)		VCM(fL)		HCM(pg)		CHCM(g/dL)		ADE(%)		Plaquetas(x10 ³ /μL)	
	Mediana	IIQ	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	8,49 ^a	1,51	11,58	1,16	34,88	3,36	40,31	2,36	13,32 ^b	0,72	33,17	0,95	17,5	1,8	522	238
Cont M2	9,21	1,63	12,40	2,43	36,80	7,29	40,55 ^a	3,05	13,58 ^{abc}	0,96	33,65	0,63	17,7	1,7	603	310
Cont M3	9,72 ^b	0,90	12,48	1,74	37,22	5,25	38,88	2,89	12,96	0,94	33,48	0,43	18,4	2,6	541	267
Cont M4	10,23	1,00	12,63 ^a	1,19	38,05 ^a	4,07	38,19 ^b	2,91	12,62 ^{abd}	0,88	33,21	1,05	18,4	2,1	584	345
Cont M5	10,13	1,27	12,25	2,21	36,09	6,54	37,33	3,00	12,62 ^b	1,10	33,91	0,91	18,1	2,0	579	325
Cont M6	9,51	1,55	11,05	1,80	32,95 ^b	6,20	36,01	3,79	12,05 ^a	1,06	33,88	2,04	19,0	3,0	483	228
Cont M7	8,90	2,81	10,88 ^b	2,78	33,02	8,51	36,77	4,00	12,38	1,10	34,08	1,43	18,2	2,4	445	299
Cont M8	9,08	1,75	11,12	1,83	34,22	6,14	38,32	6,16	12,38	1,80	32,50	1,15	18,5	0,9	451	296
Vit E M1	9,05	4,70	11,71	2,25	35,01	6,98	40,29 ^{ACD}	3,54	13,44 ^A	1,17	33,45	0,77	17,8	1,8	518	182
Vit E M2	9,30	1,63	12,70	1,84	37,54	5,73	40,65	2,91	13,72	1,17	33,82	0,85	17,9	1,6	706	394
Vit E M3	9,76	1,27	12,65	1,36	38,32	4,47	39,03 ^{ABC}	3,32	12,81	0,98	33,02	1,08	18,7	2,4	576	317
Vit E M4	10,05	2,03	13,43	1,90	40,58	5,62	39,35 ^{ABD}	2,63	12,96 ^B	0,95	33,04	0,85	18,1	1,8	504	282
Vit E M5	9,60	1,32	12,71	1,36	37,79	4,81	38,65	3,08	12,95 ^B	0,86	33,67	1,15	17,5	2,0	517	272
Vit E M6	9,57	2,34	11,92	1,50	35,03	4,31	36,75	3,77	12,42 ^B	1,05	34,07	1,67	18,8	5,2	465	158
Vit E M7	8,68	3,01	11,55	2,38	34,43	6,92	38,04 ^{BCD}	3,95	12,72	1,30	33,91	1,29	17,8	1,6	431	403
Vit E M8	9,12	4,22	10,31	3,40	31,41	6,14	37,58	2,99	12,33	1,00	32,98	1,25	17,9	1,6	567	730

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 5 - Valores dos componentes do Eritrograma de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Hemácias, ADE (ou RDW) e Plaquetas e Média e Desvio padrão (DP) para os demais parâmetros

Momentos	Hemácias($\times 10^6/\mu\text{L}$)		Hemoglobina(g/dL)		VG(%)		VCM(fL)		HCM(pg)		CHCM(g/dL)		ADE(%)		Plaquetas($\times 10^3/\mu\text{L}$)	
	Mediana	IIQ	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	8,57	1,56	11,65	1,76	34,95	5,37	40,30 ^{ABC}	2,95	13,38 ^{BC}	0,95	33,31	0,86	17,55	1,70	521	213
M2	9,26	1,59	12,55 ^{ABC}	2,11	37,17	6,44	40,60	2,92	13,65	1,05	33,74	0,74	17,80	1,18	634	384
M3	9,74	1,05	12,56 ^A	1,53	37,77 ^A	4,81	38,95 ^B	3,05	12,88 ^A	0,94	33,25	0,84	18,55 ^{ACD}	2,30	551	253
M4	10,10 ^A	1,40	13,03	1,60	39,32	4,98	38,77 ^{ABD}	2,78	12,79	0,91	33,12	0,94	18,30 ^{BCD}	1,93	532	320
M5	9,79	1,18	12,48	1,81	36,94	5,69	37,99 ^A	3,05	12,78 ^{AC}	0,98	33,79	1,02	17,70	1,95	543	263
M6	9,54	1,82	11,48	1,68	33,99 ^B	5,33	36,38 ^B	3,72	12,23 ^{BC}	1,05	33,97 ^A	1,83	18,90 ^{ABC}	3,75	483	189
M7	8,90	2,88	11,22 ^B	2,55	33,72 ^B	7,64	37,40	3,95	12,55	1,19	33,99	1,34	18,10	1,50	438	273
M8	9,10 ^B	2,82	10,71 ^{ABD}	2,71	32,82 ^B	8,66	37,95	4,76	12,36 ^{BD}	1,43	32,74 ^B	1,20	18,15 ^{ABD}	1,60	536	380

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, foram identificadas por letras sobrescritas distintas.

Na contagem total das hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), os valores aumentaram, pois houve diferença no grupo Controle, entre M1 e M3 ($p < 0,001$). Porém na avaliação dos 26 animais, M4 apresentou valores maiores que M8.

Os valores de Hemoglobina (g/dL), no grupo Controle, apresentaram ascensão com valor máximo observado em M4 seguido por queda com valor mínimo em M7 (com diferença, $p < 0,001$). Além disso, na avaliação de todos os animais, M2 apresentou valor maior que M8, além de M3 demonstrar valor maior que M7 ($p < 0,001$), caracterizando também essa queda.

Na avaliação do Volume Globular (VG) (%), o grupo Controle apresentou valor máximo em M4, seguido por queda ao mínimo em M6 ($p < 0,001$). Na avaliação dos 26 animais M3 apresentou valor mais alto que M6, M7 e M8 ($p = 0,002$), de forma similar ao grupo controle.

Na avaliação do Volume Corpuscular Médio (VCM) (fL), o grupo Vitamina E obteve seus valores máximos em M1 e M2, seguidos de diminuição até alcançar valores mínimos em M6, configurada pelas diferenças ($p < 0,001$) entre M1 e M7 e entre M3 e M4. O grupo Controle apresentou valores máximos em M1 e M2 seguidos por queda significativa em M4 e posterior manutenção dos valores, assim como ocorreu na avaliação do conjunto total de animais ($n=26$).

A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (pg) apresentou diferença nos dois grupos ($p < 0,001$). No grupo Vitamina E, o valor máximo foi evidenciado em M1, seguido por queda significativa em M5 e M6, com valor mínimo em M8. O grupo Controle apresentou valor máximo em M1 e M2, seguido por queda significativa em M5 e M6, porém, houve posterior manutenção destes valores nos momentos seguintes. De forma semelhante, a avaliação dos 26 animais, apresentou valores máximos em M1 e M2 seguidos de queda significativa com valor mínimo em M6 e posterior manutenção destes valores.

Na Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL), os valores foram mantidos constantes de M1 à M8, na avaliação dos grupos e do conjunto de 26 animais. Assim como os valores de Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (ADE ou RDW) (%) e contagem total de Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

Os valores hematológicos obtidos no eritrograma dos animais avaliados, foram considerados dentro do intervalo de normalidade durante todo o período de avaliação, quando comparados aos valores descritos por Adams et al. (1992), Radostits et al. (2002) e Rocha et al. (2013). Porém, quando comparados aos descritos por Benesi et al. (2012a), os quais avaliaram o eritrograma de 300 bezerras sadias da raça Holandesa nos primeiros 30 dias de vida, foram encontradas distinções em relação aos bezerros Wagyu neste mesmo período. Os valores médios de Contagem total de Hemácias (Hemácias) ($\times 10^6/\mu\text{L}$), Volume Globular (VG) (%), Hemoglobina (g/dL) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) descritos por Benesi et al. (2012a), são aparentemente menores que os valores apresentados pelos bezerros Wagyu. Porém, o Volume corpuscular médio (VCM) (fL) dos bezerros holandeses apresentou valores aparentemente maiores que aqueles dos bezerros Wagyu (Quadro 3).

Quadro 3 - Observação dos valores do eritrograma (média e DP, mínimos e máximos) descritos em Benesi et al. (2012a) e os encontrados na avaliação dos bezerros Wagyu, até 30 dias de vida

Componentes do eritrograma	Bezerros Holandeses Benesi et al. (2012a)	Bezerros Wagyu avaliados
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,68 ($\pm 1,15$) - 7,60 ($\pm 1,25$)	8,67 ($\pm 1,15$) - 10,15 ($\pm 1,01$)
Volume Globular (%)	29,80 ($\pm 2,67$) - 32,60 ($\pm 4,59$)	34,95 ($\pm 5,37$) - 39,32 ($\pm 4,98$)
Hemoglobina (g/dL)	9,00 ($\pm 1,24$) - 10,43 ($\pm 1,63$)	11,65 ($\pm 1,76$) - 13,03 ($\pm 1,60$)
CHCM (g/dL)	29,53($\pm 2,47$) - 31,42 ($\pm 2,36$)	33,12 ($\pm 0,94$) - 33,74 ($\pm 0,74$)
VCM (fL)	38,93 ($\pm 4,07$) - 47,68 ($\pm 4,42$)	38,77($\pm 2,78$) – 40,60 ($\pm 2,92$)

Fonte: WEISS E. C. (2017)

Legenda: Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$): Contagem total de Hemácias; VG (%): Volume Globular; CHCM (g/dL): Concentração de hemoglobina corpuscular média; VCM (fL): Volume corpuscular médio.

Importante destacar que os resultados divergentes podem decorrer de que os animais comparados eram mantidos em locais diferentes recebendo alimentação e manejo distintos. Assim sendo, as diferenças raciais e circunstanciais podem ser responsáveis por estes resultados. Aparentemente, os bezerros Wagyu avaliados apresentaram, nos primeiros 30 dias de idade, eritrócitos menores que os bezerros holandeses, sendo possível observar este fato, por apresentarem valores médios aparentemente menores de VCM neste

mesmo período. Porém, este fato parece ser compensado por um possível maior número de hemácias apresentado pelos bezerros Wagyu, visível pelos valores de VG e Hemácias. Verificou-se, também, uma aparente maior concentração de hemoglobina nos bezerros da raça Wagyu. Os resultados sugerem que, apesar do menor tamanho dos eritrócitos, há uma maior concentração média de Hemoglobina, em bezerros Wagyu, quando comparados aos bezerros da raça Holandesa avaliados por Benesi et al. (2012a). No entanto, não é possível concluir que existem reais diferenças entre o eritrograma dos bezerros Wagyu e dos Holandeses. Para tanto, seria necessário constituir grupos de bezerros holandeses criados no mesmo ambiente e manejo que os Wagyu seguido por uma análise estatística dos dados comparando-se ambas as raças.

Todos os parâmetros avaliados no eritrograma dos animais, não apresentaram diferenças entre os dois grupos (Controle e Vitamina E). Ainda, com exceção dos valores de RDW e Plaquetas, todos os outros componentes avaliados no eritrograma, apresentaram diferenças entre alguns momentos (de M1 à M8), na avaliação ao longo do tempo. Entretanto, esta evolução apresentou comportamento semelhante ao descrito por Benesi et al. (2012a), no primeiro mês de vida e por Adams et al. (1992), Kaneko e Mills (1970) e Holman (1956), durante 60 dias de avaliação.

5.2.2 Leucograma

Os resultados obtidos no Leucograma dos grupos Controle e Vitamina E, avaliados ao longo do tempo (de M1 à M8), estão descritos na Tabela 6. Enquanto os valores de Leucograma de todos os animais (n=26) estão na Tabela 7. Todos os componentes avaliados no leucograma não apresentaram distribuição normal.

Tabela 6 - Valores medianos e Intervalo interquartil (IIQ) dos componentes do Leucograma dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8)

Momentos	Leucócitos(cel/μL)		Linfócitos(cel/μL)		Monócitos(cel/μL)		Neutrófilos(cel/μL)		Eosinófilos(cel/μL)		Basófilos(cel/μL)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	7400	3150	3700	1675	343	353	2812	1874	0	72	53	150
Cont M2	7100	2900	3904	1901	360	321	2232	3155	132	158	43	80
Cont M3	5700	4250	3330	2266	315	526	1710	1863	45	144	0	53
Cont M4	5600	3950	4147	1599	273	311	1680	2007	0	120	39	81
Cont M5	5900	1400	4366	2060	295	382	1180	1199	0	29	58	63
Cont M6	6150	4615	4428	2542	495	579	1177	1288	0	31	0	0
Cont M7	7890	3650	5129	3453	576	470	700	1265	0	77	0	0
Cont M8	6300	5450	4565	4856	384	386	1331	662	0	29	0	0
Vit E M1	5600	2350	3240	1202	352	529	2652 ^A	1753	0	54	88	155
Vit E M2	6300	2400	4005	1128	441	418	1794	1492	0	75	0	32
Vit E M3	5900	2400	4158	1562	285	398	1003	2396	49	71	79	104
Vit E M4	5700	2200	4029	1779	284	340	1160	655	0	23	0	24
Vit E M5	5300	3450	3276	2297	355	274	1065	1144	0	24	0	82
Vit E M6	5400	3550	4399	2965	371	276	660 ^B	762	34	67	0	17
Vit E M7	7200	4850	5544	4115	375	498	752	841	0	25	0	0
Vit E M8	6800	4100	5576	3679	255	168	540	510	0	131	0	11

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 7 – Valores medianos e Intervalo interquartil (IIQ) dos componentes do Leucograma de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8)

Momentos	Leucócitos(cel/ μ L)		Linfócitos(cel/ μ L)		Monócitos(cel/ μ L)		Neutrófilos(cel/ μ L)		Eosinófilos(cel/ μ L)		Basófilos(cel/ μ L)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	6900	3050	3275,5 ^A	1360,3	344,0	322,8	2751,5	1798,3	0	58	70 ^{ACD}	149
M2	6750	2700	3954,5	1364,5	396,0	379,8	1815,0 ^A	1523,8	64	135	0	65
M3	5800	3300	3454,5 ^{ABC}	1872,8	307,5	490,5	1536,5	2165,3	45	78	44 ^{ABC}	120
M4	5650	2150	4088,0	1428,0	278,5	322,5	1212,0	1268,5	0	61	0	51
M5	5850	2400	3658,0 ^{ABC}	2184,5	305,0	289,5	1122,5	1114,3	0	12	17	64
M6	6125	3950	4413,5 ^B	2475,9	450,0	392,6	921,0 ^B	875,6	0	60	0	0
M7	7550	4025	5336,3	3556,0	472,0	459,0	726,0	976,5	0	61	0 ^{ABD}	0
M8	6550	3725	4803,0 ^{ABD}	3632,5	303,5	241,5	932,5	918,8	0	85	0 ^{BCD}	0

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, foram identificadas por letras sobrescritas distintas.

A contagem total de Leucócitos (CTL ou WBC) (cel/ μ L) não apresentou diferença entre momentos, na avaliação dos grupos e do total de animais. Assim como, a contagem total de Monócitos e de Eosinófilos (cel/ μ L). Porém, na Contagem Total de Linfócitos (cel/ μ L) dos 26 animais, os valores oscilaram com pequeno intervalo, tendo mínimo em M1 e máximo em M7.

Nos valores de contagem total de neutrófilos (cel/ μ L) observou-se no grupo Controle, variações com maior mediana em M1 e M2, seguida por queda e valor mínimo em M7. No grupo Vitamina E, também houve variação dos valores com maior mediana em M1 seguida por queda significativa em M6, assim como na avaliação dos 26 animais

Na avaliação do total de animais (n=26), a contagem total de Basófilos (cel/ μ L) apresentou variação em pequeno intervalo numérico (0 a 70) e significado biológico relativo.

À semelhança dos resultados observados no eritrograma, todos os componentes avaliados no leucograma dos animais não apresentaram diferenças entre os dois grupos (Controle e Vitamina E).

Os valores do Leucograma dos animais avaliados, foram considerados dentro do intervalo de normalidade durante todo o período de avaliação, quando comparados aos descritos por Radostits et al. (2002) e Adams et al. (1992). De fato, com exceção dos valores de Leucócitos, monócitos e eosinófilos, que não demonstraram variações significativas, os demais componentes avaliados no leucograma (linfócitos, neutrófilos e basófilos) apresentaram diferenças entre si em alguns momentos (de M1 à M8), na avaliação ao longo do tempo. Entretanto, esta evolução apresentou comportamento semelhante ao descrito por Benesi et al. (2012b) e Rocha et al. (2013), no primeiro mês de vida e por Kaneko e Mills (1970) e Birgel (1982), durante os 60 dias de avaliação.

A inversão da relação Neutrófilos:Linfócitos (Ne:Li), a qual ocorre durante a primeira semana de vida do bezerro neonato (BENESI et al., 2012b), não pôde ser observada nos bezerros da raça Wagyu avaliados, pois a média de idade dos animais no primeiro momento (M1) era de 7,35 (2,64) dias e neste, a inversão provavelmente já teria ocorrido, pois os animais apresentavam-se com quadro leucocitário predominantemente linfocítico em M1, permanecendo com o mesmo perfil nos momentos seguintes (de M2 à M8). Novo et al. (2015)

afirmaram que esta inversão ocorre provavelmente por volta do quarto dia de vida dos bezerros.

5.2.3 Bioquímica sérica

Todos os animais foram analisados em relação à transferência de imunidade passiva (TIP), no Momento 1 (M1), por meio da avaliação do soro sanguíneo, obtido até os 10 dias de idade, com a realização de testes indiretos de mensuração da concentração de imunoglobulinas (proteína sérica, gama glutamiltransferase, globulina e relação A:G). A partir desses testes foi realizada a comparação com os valores de referência de acordo com a literatura consultada e todos os animais foram considerados com TIP adequada. Os mesmos testes foram realizados com o soro de todos os animais ao longo tempo (de M1 à M8), para a avaliação do estado de higidez dos mesmos, incluindo também os valores de fibrinogênio. Os resultados indicaram que todos os animais apresentaram valores dentro da normalidade para as respectivas idades, em comparação aos dados da literatura. Embora estas comparações tenham sido realizadas com literatura sobre bezerros de raças diferentes da Wagyu, os resultados obtidos neste trabalho foram muito próximos e tiveram comportamento biológico similar aos descritos por outros autores.

Os resultados dos exames bioquímicos dos grupos Controle e Vitamina E, avaliados ao longo do tempo (de M1 à M8), estão descritos na Tabela 8. Enquanto os valores da análise do conjunto de todos os animais (n=26) estão na Tabela 9.

Tabela 8 - Resultado dos exames bioquímicos dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Fibrinogênio, Albumina e Gama glutamiltransferase (GGT) e Média e Desvio Padrão (DP) para os demais parâmetros

Momentos	PST(g/dL)		Globulina(g/sL)		Albumina(g/dL)		GGT(UI/L)		Fibrinogênio (mg/dL)	
	Média	DP	Média	DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	6,74	0,86	3,82 ^a	1,12	2,9	0,5	200 ^c	474	200	200
Cont M2	6,36	0,77	3,35	0,89	3,0	0,5	96 ^d	224	200	200
Cont M3	6,08	0,62	3,03 ^b	0,66	3,0 ^a	0,2	61 ^e	121	400	200
Cont M4	6,06	0,42	2,85	0,38	3,2 ^b	0,3	43 ^a	53	400	200
Cont M5	6,08	0,60	2,82	0,37	3,2	0,4	29 ^{ab}	35	400	300
Cont M6	5,90	0,29	2,65	0,22	3,2	0,3	26 ^b	19	400	300
Cont M7	5,85	0,41	2,61	0,25	3,2	0,2	19 ^{ab}	13	400	100
Cont M8	5,87	0,36	2,64	0,27	3,2	0,3	21 ^b	7	400	200
Vit E M1	6,59	1,10	3,64 ^A	1,16	2,9 ^A	0,3	231 ^A	424	200	200
Vit E M2	6,17	0,71	3,10	0,73	3,0	0,3	208	220	200	200
Vit E M3	6,01	0,54	2,87	0,54	3,1	0,2	115	112	400	400
Vit E M4	5,81	0,55	2,63 ^B	0,45	3,1	0,4	56	68	400	500
Vit E M5	5,80	0,66	2,61	0,45	3,2	0,3	31	36	400	250
Vit E M6	5,73	0,39	2,53	0,30	3,1 ^B	0,2	25 ^B	16	400	300
Vit E M7	5,74	0,43	2,52	0,38	3,3	0,3	17 ^B	16	400	200
Vit E M8	5,98	0,54	2,65	0,55	3,3	0,3	21	8	400	100

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda:PST: Proteína sérica total. Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 9 - Resultado dos exames bioquímicos de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo a Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para Fibrinogênio, Albumina e Gama glutamiltransferase (GGT) e Média e Desvio Padrão (DP) para os demais parâmetros

Momentos	PST(g/dL)		Globulina(g/dL)		Albumina(g/dL)		GGT(UI/L)		Fibrinogênio (mg/dL)	
	Média	DP	Média	DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	6,66	0,97	3,73	1,12	2,9	0,3	215,5	405,3	200	200
M2	6,26	0,73	3,23	0,81	3,0 ^C	0,3	184,0	208,3	200	200
M3	6,04	0,57	2,95 ^A	0,60	3,1 ^{AC}	0,2	84,0	108,3	400	400
M4	5,93	0,50	2,74	0,43	3,2	0,3	45,0	60,8	400	200
M5	5,94	0,64	2,72	0,42	3,2	0,3	30,0	35,5	400	250
M6	5,82	0,35	2,59 ^B	0,27	3,2 ^{BC}	0,2	25,5	16,5	400	400
M7	5,80	0,41	2,57	0,32	3,2 ^B	0,2	18,0	12,5	400	0
M8	5,92	0,46	2,65	0,43	3,3	0,3	21,0	7,0	400	50

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: PST: Proteína sérica total. Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, foram identificadas por letras sobrescritas distintas.

Os valores de proteína sérica (g/dL) e de fibrinogênio apresentaram valores praticamente constantes, sem diferença entre os momentos durante todo o período avaliado (de M1 à M8). O fibrinogênio por ser proteína de fase aguda, foi utilizado complementarmente para a avaliação do estado de higidez dos animais e demonstrou resultados dentro dos padrões de normalidade descritos por Radostits et al. (2002). A proteína sérica, apesar de não apresentar diferença, exibiu resultados com tendência à diminuição gradual dos valores a partir de M1 até M3, com posterior estabilização dos teores nos momentos seguintes. Este fato pode ter ocorrido devido ao consumo de proteínas, provenientes do colostro, nos primeiros dias de vida e posterior produção endógena das mesmas pelos bezerros, estabilizando seus valores, exatamente como descrito por Feldman, Zinkil e Jain (2000).

A mensuração dos valores séricos das globulinas (g/dL) demonstrou que, no grupo Controle, observaram-se valores maiores em M1 do que em M3, indicando queda e estabilização dos valores. No grupo Vitamina E, estes valores também foram maiores em M1, só que em relação à M4. Na avaliação total dos animais (n=26), M3 apresentou valores maiores que M6 ($p<0,001$).

A atividade de gama glutamiltransferase (GGT) (UI/L) mensurada no grupo Controle, evidenciou que M1, M2 e M3 apresentaram diferenças no confronto com todos os momentos avaliados, sendo maiores ao início e decrescentes entre M4 e M8, evidenciada pelas diferenças representadas na Tabela 8. Contudo, não foi possível observar diferença nos valores de GGT (U/L), ao longo do tempo, para os 26 animais.

Em resumo, os valores de globulina e gamaglutamiltransferase (GGT) apresentaram diminuição gradual a partir de M1 até M6, com diferença entre vários momentos. A diminuição dos valores de globulina ocorreu, provavelmente, devido ao consumo gradual desta proteína, de meia vida relativamente curta, que faz parte da imunidade passiva e foram fornecidas aos bezerros através do colostro nas primeiras horas após o nascimento (SEINO, 2014). Feitosa (1998) afirma que, por volta dos 30 a 40 dias de idade dos bezerros, ocorre uma estabilização dos valores destas proteínas, chegando a valores próximos aos descritos em bovinos adultos. Da mesma forma, os bezerros Wagyu avaliados apresentaram estabilização dos valores destas proteínas a partir de M6, em que

os animais tinham média de idade de 42,35 (2,64) dias e valores apresentados dentro dos padrões de normalidade descritos em Radostits et al. (2002).

Na mensuração da Albumina (g/dL), o grupo Controle apresentou valores de M3 menores que M4; por sua vez, no grupo Vitamina E, os valores em M1 foram menores que em M6. Na avaliação dos 26 animais, os valores de Albumina em M3 e foram menores que em M6 e M7; porém, em M2, foram menores que em M7 ($p < 0,001$).

Os valores de albumina dos bezerros Wagyu apresentaram diferença entre momentos de avaliação, pois foi possível evidenciar um aumento inicial nos valores desta proteína seguido por estabilização. Segundo Kaneko, Harhey e Bruss (1997), esta elevação dos valores de albumina ocorre desde o nascimento até os 60 dias de vida dos bezerros, devido ao desenvolvimento da capacidade de produção endógena de albumina por estes animais. Também corrobora o descrito por Rocha et al. (2013), em que há um aumento dos teores de albumina do nascimento até os 30 dias de vida dos bezerros.

5.2.4 Considerações gerais sobre o Hemograma e a Bioquímica sérica

O confronto de todos os valores encontrados no hemograma e nas análises bioquímicas dos bezerros Wagyu avaliados, com aqueles da literatura, foram aparentemente semelhantes aos descritos nos trabalhos realizados com outras raças de bovinos.

Algumas diferenças de valores observadas entre momentos (de M1 a M8), poderiam ser atribuídas não somente à idade dos animais em cada momento avaliado, mas também às mudanças no clima, temperatura e pluviosidade durante o período de avaliação, sendo importantes influências na alimentação dos bezerros e das mães. No entanto, mesmo com variações evidenciadas, todos os valores mantiveram-se dentro do intervalo de normalidade quando comparados à literatura. De fato, Benesi et al. (2012a) afirmam que, na avaliação dos exames complementares, é necessário considerar as condições ambientais e climáticas, a que os animais estão submetidos. Bach, Ahedo e Ferrer (2010) e

De Paula Vieira, von Keyserlingk e Weary (2010), comprovaram que mudanças de manejo e condições de vida dos bezerros, podem alterar seu estado de saúde e estado imunológico. Novo et al. (2015) sugerem que os bezerros podem apresentar fisiologicamente algumas alterações nos valores de parâmetros hematológicos conforme a idade, ainda que sem sair dos padrões de normalidade.

5.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR MEIO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Esta pesquisa avaliou, essencialmente, a influência da suplementação com Vitamina E na função dos neutrófilos em bezerros da raça Wagyu, durante os primeiros dois meses de vida, posto que são os tipos celulares predominantes entre os granulócitos circulantes.

Nesta avaliação da função de neutrófilos, não foram encontradas diferenças ($p < 0,0062$) entre os grupos Controle e Vitamina E, em todos os parâmetros avaliados. Porém, foram observadas diferenças ($p < 0,0017$) entre momentos avaliados, nos dois grupos, em alguns parâmetros.

5.3.1 Avaliação das porcentagens de granulócitos e intensidade de produção de EROs com e sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI

Realizou-se a quantificação da porcentagem de granulócitos e a avaliação da intensidade de produção de EROS sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI. A mesma avaliação foi realizada para os granulócitos que receberam estímulo (SaPI), para possível aumento da produção de EROs.

Para os grupos Controle e Vitamina E, os valores das porcentagens de granulócitos com produção de EROs, que receberam ou não o estímulo pela fagocitose de SaPI, bem como a intensidade desta produção, constam na Tabela

10 e nos gráficos 1 e 3 (para os granulócitos sem estímulo), e 5 e 7 (para os granulócitos com estímulo pela fagocitose de SaPI).

Para o conjunto total dos animais (n=26), os valores das porcentagens de granulócitos com produção de EROs que receberam ou não o estímulo, bem como, a intensidade desta produção, constam na Tabela 11 e nos gráficos 2 e 4 (para os granulócitos sem estímulo), e 6 e 8 (para os granulócitos com estímulo pela fagocitose de SaPI).

Tabela 10 - Resultado da avaliação da produção de EROs pelos neutrófilos, com e sem estímulo SaPI, dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), em Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros

Momentos	% EROS (+) (sem estímulo)		Intens. EROS (sem estímulo)		% EROS (+) (com estímulo)		Intens. EROS (com estímulo)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	19,60 ^a	60,83	693,83	5238,12	44,64	47,80	2577,79	7111,31
Cont M2	94,82 ^b	6,38	8896,50 ^b	5602,95	48,63	37,00	9750,16	9761,66
Cont M3	94,31	13,36	2793,48	842,03	65,21	18,94	3655,39	1218,39
Cont M4	95,59	-	4676,36	-	45,29	-	3384,17	-
Cont M5	94,20 ^b	3,19	4850,98 ^a	2278,04	46,92	27,86	2646,67	1595,15
Cont M6	92,04 ^{bc}	16,54	1101,49 ^b	455,97	56,38	25,63	2429,52	1585,58
Cont M7	95,00 ^{bd}	4,96	1408,32	343,79	68,80	22,75	1837,84	695,25
Cont M8	93,64	45,99	1052,50	526,75	45,20	26,33	1152,95	462,60
Vit E M1	15,11 ^A	21,34	697,75	152,61	39,39	25,63	4154,21	4230,51
Vit E M2	95,23 ^B	4,59	10429,43	4001,50	32,14	26,33	10431,57 ^A	13472,55
Vit E M3	87,88	10,50	2941,00	812,91	60,02	23,07	3348,44	1295,16
Vit E M4	96,68	-	5485,89	-	35,38	-	3341,08	-
Vit E M5	92,13 ^B	4,33	5030,73	2524,44	47,64	24,52	2746,54 ^B	3348,49
Vit E M6	91,71 ^B	3,97	1255,72	432,21	45,39	24,46	2469,97	885,16
Vit E M7	94,69	4,61	1522,06 ^A	515,65	63,76	25,30	1918,58 ^B	1058,00
Vit E M8	91,33	5,19	965,73 ^B	368,02	41,75	15,04	1130,86	412,04

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: % EROS (+) (sem estímulo) = Porcentagem de células com produção de EROS, sem receber estímulo SaPI (%); Intens. EROS (sem estímulo) = Intensidade de produção de EROS pelas células que não receberam estímulo SaPI; % EROS (+) (com estímulo) = Porcentagem de células com produção de EROS, após receberem estímulo SaPI (%); Intens. EROS (com estímulo) = Intensidade de produção de EROS pelas células que receberam estímulo SaPI. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 11 - Resultado da produção de EROs pelos neutrófilos, com e sem estímulo SaPI, de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo em Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros

Momentos	% EROS(+) (sem estímulo)		Intens. EROS (sem estímulo)		% EROS(+)(com estímulo)		Intens. EROS (com estímulo)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	18,97	30,37	695,99	185,77	39,61	33,60	3940,98	5450,79
M2	95,06	5,65	10125,90	4781,57	38,13	32,62	10090,87	12606,85
M3	91,03	10,68	2848,06	782,59	64,47	18,55	3517,59	1097,72
M4	95,59	9,72	4717,42	2245,05	43,40	22,77	3384,17	1049,21
M5	93,32	3,85	4950,69	1682,80	47,28	28,10	2696,61	2544,81
M6	91,88	7,45	1204,83	357,65	48,71	26,47	2449,75	1032,13
M7	94,90	4,47	1505,81	421,87	66,21	20,46	1848,51	666,86
M8	92,88	6,30	975,27	290,03	42,62	21,90	1141,91	469,57

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: % EROS (+) (sem estímulo) = Porcentagem de granulócitos com produção de EROS, sem receber estímulo SaPI (%); Intens. EROS (sem estímulo) = Intensidade de produção de EROS pelos granulócitos que não receberam estímulo SaPI; % EROS (+) (com estímulo) = Porcentagem de granulócitos com produção de EROS, após receberem estímulo SaPI (%); Intens. EROS (com estímulo) = Intensidade de produção de EROS pelos granulócitos que receberam estímulo SaPI. Não houve diferença entre os momentos.

5.3.1.1 Avaliação da porcentagem de granulócitos produtores de EROs, e da intensidade desta, sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI.

Na avaliação da produção de EROs sem estímulo, um aumento na porcentagem de células com produção de H_2O_2 (EROs+) foi observado a partir de M2. Este aumento pode ser evidenciado nos dois grupos (Controle e Vitamina E). O grupo Controle apresentou valores de M1 menores que os de M2, M5, M6 e M7 ($p<0,001$) além de menores valores em M6, quando comparados a M7 ($p=0,002$). De forma semelhante, no grupo Vitamina E, M1 apresentou valores menores que M2, M5 e M6 ($p=0,002$), como pode ser observado no Gráfico 1. Destaca-se que, no mesmo período, ocorreu uma diminuição fisiológica na contagem total dos neutrófilos. O aumento na porcentagem de células produzindo EROs, ocorreu nos animais com idade média de 14,35 ($\pm 2,64$) dias, mantendo-se, de M2 a M8, valores constantes, sem diferenças, quando considerados nos grupos Controle e Vitamina E. Ambos grupos apresentaram valores menores em M1 em comparação aos momentos seguintes. Este fato pode sugerir que, entre 7,35 ($\pm 2,64$) e 14,35 ($\pm 2,64$) dias de idade, há um aumento na porcentagem global de granulócitos em atividade, com produção de H_2O_2 . No entanto, não houve diferenças entre os momentos nas porcentagens de granulócitos EROs+ obtidas na avaliação dos 26 animais (Gráfico 2).

De forma semelhante, Costa et al. (2017) relataram um aumento destas mesmas porcentagens de granulócitos com produção de EROs aos 14 dias de idade de bezerras holandesas com colostragem adequada.

Gráfico 1 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROs (EROs+), sem estímulo.

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: % EROS (+) (sem estímulo) = Porcentagem de granulócitos com produção de EROs, sem receber estímulo pela fagocitose de SaPI. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 2 - Variações de mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROs (EROs+) sem estímulo, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: % EROS (+) (sem estímulo) = Porcentagem de granulócitos com produção de EROs, sem receber estímulo pela fagocitose de SaPI.

Na avaliação da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos, sem estímulo, foi observada uma diminuição desta a partir de 14,35 ($\pm 2,64$) até os 56,35 ($\pm 2,64$) dias de idade dos animais, no grupo Controle, representada pelas diferenças encontradas entre M2 e outros dois momentos, M5 e M6, além de diferença entre M7 e M8. O grupo Vitamina E também apresentou diminuição, porém, com diferença significativa entre as duas últimas semanas de avaliação, com animais com idade entre 49,35 ($\pm 2,64$) (M7) e 56,35 ($\pm 2,64$) (M8) dias (Gráfico 3). Assim como a avaliação percentual, a intensidade de produção de EROs sem estímulo, também não apresentou diferenças entre os diferentes momentos, na avaliação dos 26 animais (Gráfico 4).

Costa et al. (2017) relataram um aumento desta intensidade nas três primeiras semanas de vida em bezerras holandesas. Porém, sua avaliação limitou-se até os 30 dias de vida dos animais, período em que os bezerros Wagyu apresentaram oscilação destes valores, com diminuição a partir dos 14 dias de idade.

Gráfico 3 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs, entre as células EROs(+) sem estímulo.

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs (sem estímulo) = Intensidade de produção de EROs pelos granulócitos que não receberam estímulo pela fagocitose de SaPI. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 4 - Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs basal das células EROS(+) sem estímulo, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs (sem estímulo) = Intensidade de produção de EROs pelos granulócitos que não receberam estímulo pela fagocitose de SaPI.

5.3.1.2 Produção de EROs pelos granulócitos, com estímulo pela fagocitose de SaPI

Na avaliação da porcentagem de granulócitos produzindo EROs (EROs+), com adição do estímulo por fagocitose de *S. aureus*, não houve diferenças entre os momentos, na avaliação dos grupos Controle e Vitamina E (Gráfico 5) e também, na avaliação dos 26 animais em conjunto (Gráfico 6), podendo indicar que os valores de porcentagens de células EROs+ mantiveram-se estáveis de M1 à M8, após a adição do estímulo.

Costa et al. (2017) relataram também que, com adição do estímulo pela fagocitose de SaPI, os granulócitos mantiveram constante porcentagem de células com produção de H_2O_2 da primeira semana até os 30 dias de idade, não havendo grandes variações destas células (%) e sem diferenças entre os momentos de avaliação.

Gráfico 5 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de granulócitos com produção de EROs (EROs(+)), após estímulo pela fagocitose de SaPI.

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: % EROS (+) (com estímulo) = Porcentagem de granulócitos com produção de EROs, após receberem estímulo pela fagocitose de SaPI

Gráfico 6 - Mediana e IIQ das porcentagens das porcentagens de granulócitos (%) com produção de EROs (EROs+), após estímulo pela fagocitose de SaPI, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: % EROs (+) (com estímulo) = Porcentagem de granulócitos com produção de EROs, após receberem estímulo pela fagocitose de SaPI.

Na intensidade de produção de EROs após estímulo com a fagocitose de SaPI, foram observadas diferenças apenas entre momentos do grupo Vitamina E. Nos granulócitos obtidos dos animais deste grupo ocorreu uma diminuição da intensidade de produção de EROs a partir de M3, em que os animais possuíam média de 21,35 ($\pm 2,64$) dias de idade, momento em que iniciou um decréscimo dos valores em relação à M2. Observou-se diferenças entre M2 e M5, bem como entre M2 e M7 (Gráfico 7). Merece destaque que ainda não foram publicados, trabalhos que relacionem a suplementação de Vitamina E com a diminuição da intensidade de produção de H_2O_2 dos granulócitos em bovinos.

O grupo controle apresentou comportamento semelhante neste parâmetro de avaliação, com tendência de diminuição da intensidade de produção de EROs a partir de M3. Porém, não foi possível encontrar diferenças significativas entre os momentos neste grupo. Contudo, também não foram evidenciadas diferenças entre os grupos Vitamina E e Controle para a intensidade de EROs, após adição de SaPI, e a avaliação deste parâmetro, para o conjunto dos 26 animais, não apresentou diferenças entre os momentos do estudo (Gráfico 8). Costa et al. (2017), também descreveram que a intensidade de produção de H_2O_2 pelos granulócitos estimulados por SaPI manteve valores estáveis na maior parte dos momentos avaliados durante os primeiros 30 dias de vida.

Gráfico 7 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de avaliação (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs, entre os granulócitos EROS(+) após estímulo pela fagocitose de SaPI.

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs (com estímulo) = Intensidade de produção de EROs pelos granulócitos que receberam estímulo pela fagocitose de SaPI. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 8 - Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs dos granulócitos EROS(+), após estímulo pela fagocitose de SaPI, de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs (com estímulo) = Intensidade de produção de EROs pelos granulócitos que receberam estímulo pela fagocitose de SaPI.

5.3.1.3 Considerações sobre avaliação dos granulócitos produzindo EROs, com ou sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI.

A avaliação dos granulócitos dos bezerros Wagyu demonstrou que as porcentagens de células com produção de EROs sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI, apresentaram aparente aumento em M2 em comparação à M1, quando alcançaram cerca de 20% dos granulócitos. Porém, posteriormente estes valores mantiveram-se estáveis, em mais de 90% de granulócitos nas semanas seguintes. Em contrapartida, com a adição do estímulo pela fagocitose de SaPI, as porcentagens de granulócitos produzindo EROs apresentaram comportamento diferente, pois houve uma estabilidade destes dados em cerca de 50% dos granulócitos, desde M1 até M8.

Por sua vez, a intensidade de produção de EROs pelos granulócitos dos bezerros Wagyu apresentou comportamento semelhante com e sem adição de estímulo pela fagocitose de SaPI. Em ambos os casos foi possível observar um aumento aparente na intensidade de produção de EROs na segunda semana de vida (M2) em relação à primeira semana, seguido de uma diminuição gradual destes valores até M8. Houve então, uma semelhança de comportamento na intensidade de produção de EROs entre os granulócitos que receberam estímulo e aqueles que não receberam.

Assim sendo, no presente trabalho observou-se nos bezerros Wagyu, uma menor quantidade de granulócitos com produção de EROs e menor intensidade desta nos animais com média de idade de 7,35 ($\pm 2,64$) dias, quando comparados aos mesmos animais com 14,35 ($\pm 2,64$) dias de idade. Este fato pode sugerir uma menor eficiência de produção de EROs pelos granulócitos destes animais na primeira semana de vida e um maior desafio imunológico destas células na segunda semana de vida.

5.3.2 Avaliação das quatro populações de granulócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4), classificados pela análise da fluorescência captada pelo detector FL1 em função daquela captada pelo FL3.

De acordo com a análise das fluorescências detectadas por FL1 e FL3, foi possível identificar as porcentagens e intensidades médias de quatro diferentes subpopulações de granulócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4):

- **Q1:** granulócitos que estavam fagocitando SaPI, mas não estavam produzindo EROs;
- **Q2:** granulócitos que estavam fagocitando SaPI e, também, estavam produzindo EROs;
- **Q3:** granulócitos que não estavam fagocitando SaPI e, também, não estavam produzindo EROs;
- **Q4:** granulócitos que não estavam fagocitando SaPI, mas estavam produzindo EROs;

As porcentagens destas populações de granulócitos dos animais dos grupos Controle e Vitamina E, estão descritas na Tabela 12. A mesma análise foi realizada para o conjunto de 26 animais, e consta na Tabela 13.

A intensidade de produção de EROs (intensidade de fluorescência do DCF, captada pelo detector FL1) foi identificada nas subpopulações de granulócitos Q2 e Q4, enquanto a intensidade de fagocitose (intensidade de fluorescência do PI, captada pelo detector FL3), foi analisada nas subpopulações de granulócitos Q1 e Q2. Esta análise pode ser observada na Tabela 14, para os animais dos grupos Controle e Vitamina E. Os dados obtidos do conjunto de 26 animais, constam na Tabela 15.

Tabela 12 - Resultado da avaliação das porcentagens (%) de granulócitos, nas quatro subpopulações (Q1, Q2, Q3 e Q4) classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), em Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros

Momentos	% Q1 (EROS- SaPI+)		% Q2 (EROS+ SaPI+)		% Q3 (EROS- SaPI-)		% Q4 (EROS+ SaPI-)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	43,49	32,82	29,08	38,58	7,63 ^a	22,83	3,82	12,87
Cont M2	51,09	35,73	36,70	20,12	0,08 ^b	0,24	10,70	15,31
Cont M3	29,54	19,57	42,52	15,64	0,83	1,19	23,03	21,77
Cont M4	53,32	-	44,68	-	0,17	-	1,60	-
Cont M5	51,28	27,99	42,00 ^a	19,22	0,11 ^b	0,19	6,56 ^a	12,70
Cont M6	42,21	25,58	41,43	24,92	0,22 ^b	0,52	11,34	11,74
Cont M7	29,90	22,55	39,42	9,83	0,46 ^b	0,54	28,12 ^b	13,68
Cont M8	52,61	23,98	27,28 ^b	8,25	1,05	1,69	17,15	24,07
Vit E M1	46,08	13,35	35,59	30,21	10,46 ^A	21,80	3,06	7,21
Vit E M2	64,57	25,74	28,42	0,30	0,23 ^B	0,46	3,61	5,17
Vit E M3	37,97	24,01	43,63	13,30	1,29	1,66	24,05	20,07
Vit E M4	63,30	-	34,31	-	0,20	-	2,10	-
Vit E M5	51,15	24,72	41,28	19,12	0,16 ^B	0,18	4,64 ^A	7,04
Vit E M6	53,56	23,86	33,49	13,70	0,19 ^B	0,43	6,48	12,31
Vit E M7	35,55	25,21	38,92 ^A	15,09	0,66 ^B	0,54	19,61 ^B	20,36
Vit E M8	55,80	15,03	25,88 ^B	4,90	0,51 ^B	0,48	14,30 ^B	12,40

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: % Q1 (EROS- SaPI+) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q1; % Q2 (EROS+ SaPI+) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q2; % Q3 (EROS- SaPI-) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q3; % Q4 (EROS+ SaPI-) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q4. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 13 - Resultado da avaliação das porcentagens (%) de granulócitos, nas quatro subpopulações (Q1, Q2, Q3 e Q4) classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, de todos os animais, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros

Momentos	% Q1 (EROS- SaPI+)		% Q2 (EROS+ SaPI+)		% Q3 (EROS- SaPI-)		% Q4 (EROS+ SaPI-)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	44,79	27,57	32,34	32,42	7,93	22,37	3,38	9,04
M2	61,29	32,93	31,16	20,83	0,14	0,32	4,90	11,84
M3	32,66	19,52	42,57	14,05	1,27	1,32	23,99	19,49
M4	55,66	22,39	40,53	19,27	0,17	0,18	1,60	4,20
M5	51,22	27,94	41,64	18,88	0,13	0,18	5,48 ^A	9,33
M6	50,24	27,04	36,23	18,18	0,20	0,36	10,04 ^B	12,05
M7	32,81	21,00	39,41	11,57	0,49	0,53	23,02 ^{AC}	15,29
M8	55,45	20,64	26,88	5,61	0,69	0,84	15,56 ^{BC}	19,09

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: % Q1 (EROS- SaPI+) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q1; % Q2 (EROS+ SaPI+) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q2; % Q3 (EROS- SaPI-) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q3; % Q4 (EROS+ SaPI-) = Porcentagem de granulócitos classificadas na subpopulação Q4. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 14 - Resultado da avaliação da intensidade de produção de EROS e da intensidade de fagocitose, nas três subpopulações de granulócitos (Q1, Q2 e Q4), classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período do estudo (de M1 à M8), sendo Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros

Momentos	Intens SaPI Q1 (EROS- SaPI+)		Intens EROS Q2 (EROS+ SaPI+)		Intens SaPI Q2 (EROS+ SaPI+)		Intens EROS Q4 (EROS+ SaPI-)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	9968,37 ^a	3817,02	3556,46 ^{acd}	5665,33	9584,82	9608,41	720,06	7429,46
Cont M2	19041,88	5139,53	9696,71	10650,95	8819,51	8111,51	11069,21	9034,27
Cont M3	11333,18	2030,83	3516,43	1758,97	7502,96	5679,72	3377,12	653,20
Cont M4	13312,51	-	3101,09	-	13878,90	-	5623,78	-
Cont M5	13310,85 ^b	2085,02	2506,92 ^{abc}	1591,35	10761,70	8083,14	5194,23	2731,25
Cont M6	17161,94	2904,42	2647,61	1992,88	9884,74	4298,51	1599,66	620,33
Cont M7	14041,61 ^b	4642,40	2184,64 ^{bcd}	1247,23	5639,75 ^a	3400,48	1470,12	214,95
Cont M8	19006,60	6394,12	1091,79 ^{abd}	772,78	14191,44 ^b	11502,86	1074,12	164,16
Vit E M1	10271,92 ^A	3441,06	4575,80	3678,49	14345,56	8308,81	657,45	144,97
Vit E M2	19135,29	2119,31	10868,89 ^A	13560,29	13046,34	4881,57	10231,96	6830,00
Vit E M3	10551,45	1003,60	3697,25	1475,11	8137,02	4956,54	2975,35	1087,04
Vit E M4	13852,58	-	3080,56	-	16128,79	-	3106,61	-
Vit E M5	13440,21 ^B	1432,20	2445,40 ^B	3289,91	13268,60	5366,64	5080,84 ^A	2901,61
Vit E M6	16484,31 ^B	3858,19	2796,59	1232,89	10898,15	7400,39	1565,94 ^B	452,40
Vit E M7	13695,12	5742,37	2030,71 ^B	1481,56	7570,25 ^A	8014,12	1516,72	333,05
Vit E M8	20099,38 ^C	3238,50	984,11	630,68	17631,23 ^B	9816,61	1315,99	1184,71

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: Intens SaPI Q1 (EROS- SaPI+) = intensidade de Fagocitose de SaPI pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q1; Intens EROS Q2 (EROS+ SaPI+) = intensidade de produção de EROS pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q2; Intens SaPI Q2 (EROS+ SaPI+) = intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q2; Intens EROS Q4 (EROS+ SaPI-) = intensidade da produção de EROS pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q4. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

Tabela 15 - Resultado da avaliação da intensidade de produção de EROS e da intensidade de fagocitose, nas três subpopulações de granulócitos (Q1, Q2 e Q4), classificadas de acordo com a análise de FL1 e FL3, de todos os animais (n=26), ao longo do período do estudo (de M1 à M8), sendo Mediana e Intervalo interquartil (IIQ) para todos dos parâmetros

Momentos	Intens SaPI Q1 (EROS- SaPI+)		Intens EROS Q2 (EROS+ SaPI+)		Intens SaPI Q2 (EROS+ SaPI+)		Intens EROS Q4 (EROS+ SaPI-)	
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	10129,91	3678,75	4420,80	4790,02	10213,69	7712,39	673,76	210,55
M2	19086,27	2198,84	10230,67	13000,10	12371,47	7293,95	10808,96	6963,75
M3	10803,15	1748,56	3697,25	1566,62	7779,20	5108,14	3248,67	846,22
M4	13816,68	826,50	3101,09	1199,13	13878,90	8053,20	4820,08	3802,96
M5	13375,53	1544,23	2476,16	2453,09	11366,52 ^A	7013,92	5137,54	2399,60
M6	16679,95	3529,92	2789,79	1366,18	10424,75	5392,44	1593,86	499,99
M7	14004,22	4855,21	2182,91	1205,38	7106,17	3797,78	1492,06	264,68
M8	19692,55	3853,45	1028,78	677,37	15197,30 ^B	9648,97	1155,12	298,44

Fonte: (WEISS, E. C. 2017)

Legenda: Intens SaPI Q1 (EROS- SaPI+) = intensidade de Fagocitose de SaPI pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q1; Intens EROS Q2 (EROS+ SaPI+) = intensidade de produção de EROS pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q2; Intens SaPI Q2 (EROS+ SaPI+) = intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q2; Intens EROS Q4 (EROS+ SaPI-) = intensidade da produção de EROS pelos granulócitos classificadas na subpopulação Q4. As diferenças entre os momentos de cada parâmetro, dentro de cada grupo, foram identificadas por letras sobrescritas distintas, minúsculas para o Grupo Controle (Cont) e maiúsculas para o grupo Vitamina E (Vit E).

5.3.2.1 Q1: granulócitos que estavam fagocitando SaPI, mas não estavam produzindo EROs (EROS- e SaPI+)

5.3.2.1.1 Porcentagem (%) de granulócitos em Q1

Na análise da fluorescência captada por FL1 em função da fluorescência captada por FL3, observa-se que, em Q1 (granulócitos que estavam fagocitando SaPI, mas não estavam produzindo EROs), não houve diferença na porcentagem de granulócitos, entre os momentos avaliados, nos diferentes grupos (Gráfico 9) e na avaliação dos 26 animais (Gráfico 10), havendo uma estabilidade das porcentagens de granulócitos SaPI+ e EROS-, durante todo o período de avaliação.

Gráfico 9 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de granulócitos na subpopulação Q1 [EROs(-) e SaPI(+)]

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q1 (EROs - e SaPI +) = Porcentagem de granulócitos que fagocitaram SaPI, porém não produziram EROs.

Gráfico 10 - Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROS (EROS+) na subpopulação Q1 [EROS(-) e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q1 (EROS- e SaPI+) = Porcentagem de granulócitos que fagocitaram SaPI, porém não produziram EROs.

5.3.2.1.2 Intensidade de fagocitose pelos granulócitos em Q1

Observou-se diferença, entre os momentos, na intensidade de fagocitose, nos dois grupos avaliados (Gráfico 11). No grupo Controle houve diferença entre M1 e M5 e entre M1 e M7; no grupo Vitamina E, a diferença ocorreu entre M1 e: M5, M6 e M8, além de ocorrer diferença entre M5 e M8. Estes resultados demonstraram um aumento da intensidade de fagocitose, nos dois grupos, a partir dos 21,35 ($\pm 2,64$) (M3) dias de idade dos animais até o último momento avaliado, em que os animais apresentaram média de idade de 56,35 ($\pm 2,64$) dias, sendo este período o mesmo em que se observa uma diminuição gradual fisiológica da contagem total dos neutrófilos (células/ μ L). Porém, não ocorreram diferenças entre os dois grupos. Na avaliação do conjunto dos 26 animais, não foi possível encontrar diferenças na intensidade de fagocitose, entre os momentos estudados (Gráfico 12).

Gráfico 11 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de fagocitose pelos granulócitos da subpopulação Q1 [EROs(-) e SaPI(+)].

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. SaPI Q1 (EROs- e SaPI+)= Intensidade de fagocitose, nos granulócitos que fagocitaram SaPI, porém não produziram EROs. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 12 - Mediana e IIQ da intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos da subpopulação Q1 [EROs(-) e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. SaPI Q1 (EROs- e SaPI+) = Intensidade de fagocitose, nos granulócitos que fagocitaram SaPI, porém não produziram EROs.

5.3.2.2 Q2: granulócitos que estavam fagocitando SaPI e também, estavam produzindo EROs (EROS+ e SaPI+)

5.3.2.2.1 Porcentagem (%) de granulócitos em Q2

Na análise da fluorescência captada por FL1 em função da fluorescência captada por FL3, observa-se que, em Q2, houve diferença, entre os momentos avaliados, na porcentagem de granulócitos que realizaram a fagocitose de SaPI e também, produziram H_2O_2 (SaPI+ e EROS+), nos diferentes grupos (Gráfico 13). No grupo controle houve diferença entre M5, que apresentou valor máximo e M8 com valor mínimo; por sua vez no grupo Vitamina E, M7 apresentou valor mais alto que M8, sendo possível observar uma diminuição destas porcentagens nas últimas semanas de avaliação, no segundo mês de vida. Porém, na avaliação dos 26 animais demonstrou-se ausência de diferenças entre os momentos (Gráfico 14).

Neste contexto, Costa et al. (2017) relataram que a porcentagem de células que realizaram fagocitose (Q1 e Q2), teve seu pico máximo na primeira semana de vida dos bezerros. Por sua vez, Batista et al. (2015) encontraram uma maior porcentagem de fagocitose (provavelmente somando-se as populações Q1 e Q2), nas primeiras três semanas de vida de bezerros holandeses, seguida por uma diminuição destes valores, nas semanas seguintes, até os 90 dias de vida dos animais. Os autores explicam que este resultado decorre da ação provável de citocinas colostrais, que, após a absorção pelo bezerro, migram para a circulação e estimulam a atividade celular imune no primeiro mês de vida.

Gráfico 13 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de granulócitos na subpopulação Q2 [EROS(+) e SaPI(+)].

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q2 (EROS+ e SaPI+) = Porcentagem de granulócitos que fagocitaram SaPI e produziram EROS. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 14 - Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROS (EROS+) na subpopulação Q2 [EROS(+) e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q2 (EROS+ e SaPI+) = Porcentagem de granulócitos que fagocitaram SaPI e produziram EROS.

5.3.2.2.2 Intensidade de fagocitose pelos granulócitos em Q2

Na intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos classificados em Q2 (que estavam, também, produzindo EROs), observou-se diferenças entre M7 e M8 em ambos os grupos (Gráfico 15), além de diferença entre M5 e M8, na avaliação dos 26 animais (Gráfico 16). Tais resultados demonstram que esta intensidade se mantém constante durante o primeiro mês e parte do segundo mês de vida dos bezerros, havendo um aumento detectado apenas aos 56,35 ($\pm 2,64$) dias, período em que existe um declínio das proteínas séricas responsáveis pela imunidade passiva.

Gráfico 15 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos da subpopulação Q2 [EROS(+) e SaPI(+)].

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. SaPI Q2 (EROS+ e SaPI+) = Intensidade de fagocitose, nos granulócitos que fagocitaram SaPI e produziram EROs. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas

Gráfico 16 - Mediana e IIQ da intensidade de fagocitose de SaPI pelos granulócitos da subpopulação Q2 [EROs(+) e SaPI(+)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. SaPI Q2 (EROs+ e SaPI+) = Intensidade de fagocitose, nos granulócitos que fagocitaram SaPI e produziram EROs. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas

Batista et al. (2015) avaliaram o sistema imune inato de bezerros da raça Holandesa, através da fagocitose e da produção de radicais livres por neutrófilos estimulados pela fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli*, durante os primeiros 90 dias de vida. De forma semelhante ao observado nos bezerros Wagyu, esses autores encontraram aumento da intensidade de fagocitose de *S. aureus* no final do segundo mês de vida dos animais. Os autores, justificaram o fato considerando que a maturação do sistema imunológico dos bovinos não ocorre antes do quinto mês de vida e que, antes deste período, os animais são capazes de responder a um patógeno, embora a resposta seja mais fraca, mais lenta e menos eficiente do que a dos animais com sistema imune maduro. Ainda, os mesmos autores, destacaram que a atividade de fagocitose das células mono e polimorfonucleares, no primeiro mês de vida dos animais, sofre grande influência de citocinas colostrais, absorvidas pelo intestino do bezerro após a mamada do colostro e que vão à corrente sanguínea, onde permanecem com ação sobre os leucócitos, principalmente, nas três primeiras semanas de vida dos bezerros.

Por sua vez, Costa et al. (2017) observaram maior intensidade de fagocitose nas duas primeiras semanas de vida de bezerras holandesas. Porém,

é preciso ressaltar que os dois trabalhos citados, não realizaram a classificação dos granulócitos em diferentes populações, portanto a intensidade de fagocitose foi, provavelmente, analisada juntando-se Q1 e Q2, ou seja, todos os granulócitos que estavam fagocitando, sem que fosse levada em consideração sua produção de EROs.

5.3.2.2.3 Intensidade de EROs pelos granulócitos em Q2

Na análise da intensidade de produção de H_2O_2 por estas mesmas células (granulócitos que estavam fagocitando SaPI e também, produzindo EROs), os dois grupos apresentaram valores mais altos nas duas primeiras semanas de vida, seguidos de um decréscimo a partir dos 14,35 ($\pm 2,64$) dias de vida. Neste período, o grupo Controle apresentou valores mais elevados em M1 do que em M7 e em M5 do que em M8; por sua vez o grupo Vitamina E apresentou valor mais alto em M2 com diferença em comparação a M5 e M7 (Gráfico 17). Porém, não houve diferenças entre os grupos. Da mesma forma, a avaliação do conjunto dos 26 animais não demonstrou diferença (Gráfico 18), entre os momentos, na intensidade de produção de EROs pelas células do Q2, significando que os valores se mantêm constantes da primeira semana até os dois meses de vida dos animais.

Gráfico 17 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs, entre as células EROs(+), na subpopulação Q2 [EROs(+) e SaPI(+)].

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs Q2 (EROS+ e SaPI+) = Intensidade de produção de EROs, dos granulócitos que fagocitaram SaPI. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 18 - Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos da subpopulação Q2 [EROS(+) e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROS Q2 (EROS+ e SaPI+) = Intensidade de produção de EROs, dos granulócitos que fagocitaram SaPI.

5.3.2.3 Q3: granulócitos que não estavam fagocitando SaPI e também, não estavam produzindo EROs (EROs- e SaPI-)

5.3.2.3.1 Porcentagem (%) de granulócitos em Q3

A porcentagem de granulócitos classificados em Q3 (granulócitos que não estavam fagocitando SaPI e nem estavam produzindo EROs) apresentou diferenças entre momentos, na avaliação dos diferentes grupos. Em ambos os grupos (Gráfico 19), a porcentagem destas células foi mais alta na primeira semana de avaliação (M1), seguida por diminuição destes valores nos momentos seguintes avaliados. No grupo Controle, houve diferença entre M1 e: M2, M5, M6 e M7, semelhante ao grupo Vitamina E, em que a diferença foi entre M1 e: M2, M5, M6, M7 e M8. Porém, não houve diferença na porcentagem destas células na avaliação do conjunto de 26 animais (Gráfico 20). Pequenas porcentagens de células em Q3, significam que os granulócitos estão exercendo suas funções de fagocitose (portanto, classificados nos quadrantes Q1 ou Q2) e/ou de produção de EROs (portanto, classificados nos quadrantes Q2 ou Q4). Assim, baixas porcentagens de células em Q3, como ocorreu a partir de M2, podem ser desejáveis.

Gráfico 19 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de células na subpopulação Q3 [EROS(-) e SaPI(-)]

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q3 (EROS- e SaPI-) = Porcentagem de granulócitos que não fagocitaram SaPI e também não produziram EROS. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 20 - Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROS (EROS+) na subpopulação Q3 [EROS(-) e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q3 (EROS- e SaPI-) = Porcentagem de granulócitos que não fagocitaram SaPI e também não produziram EROS.

5.3.2.4 Q4: granulócitos que não estavam fagocitando SaPI, mas estavam produzindo EROs (EROS+ e SaPI-)

5.3.2.4.1 Porcentagem (%) de granulócitos em Q4

Na avaliação das porcentagens de granulócitos classificados em Q4 (granulócitos que não estavam fagocitando SaPI, mas estavam produzindo EROs), as porcentagens de células foram menores em M5 em comparação ao M7 nos dois grupos, como também ao M8, no grupo Vitamina E (Gráfico 21). Na análise dos 26 animais (Gráfico 22), o M5 apresentou valores menores que M6 e M8. Isto significa que, a partir dos 35,35 (2,64) dias de idade, os animais apresentaram um aumento destas porcentagens até o final do segundo mês de vida, evidenciado pela diferença observada. Neste mesmo momento, estas células apresentaram sua maior intensidade de produção de EROs, representada pela diferença encontrada na intensidade no M5, que apresentou valores maiores que M6, no grupo Vitamina E. Apesar desta observação, a análise do conjunto de 26 animais não demonstrou diferença entre os momentos.

Gráfico 21 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ das porcentagens de células na subpopulação Q4 [EROs(+) e SaPI(-)]

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q4 (EROs+ e SaPI-) = Porcentagem de granulócitos que não fagocitaram SaPI porém produziram EROs. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 22 - Mediana e IIQ das porcentagens de células com produção de EROs (EROs+) na subpopulação Q4 [EROs(+) e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: %Q4 (EROs+ e SaPI-) = Porcentagem de granulócitos que não fagocitaram SaPI, porém produziram EROs. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas

Costa et al. (2017) relataram uma diminuição gradual nas porcentagens de granulócitos com produção de EROs do início ao fim do primeiro mês de vida.

Os autores não realizaram a separação dos granulócitos em diferentes populações, portanto, a porcentagem de células com produção de EROs e a intensidade desta, foram provavelmente analisadas juntando-se Q2 e Q4. Em oposição ao encontrado no presente trabalho, Batista et al. (2015) relataram maior porcentagem de células produtoras de EROs, mono- e polimorfonucleares, em bezerros da raça Holandesa de 8 a 14 dias de idade, em comparação a animais com 31 a 40 dias de idade.

As porcentagens de células encontradas em cada subpopulação (Q1, Q2, Q3 e Q4), em fêmeas bovinas adultas da raça Holandesa, descritas por Azedo (2007), foram numericamente menores do que as encontradas nos bezerros Wagyu avaliados, bem como as intensidades de fagocitose e de produção de EROs. Porém, o autor avaliou as características em leucócitos totais, sem a análise da população de neutrófilos separadamente.

5.3.2.4.2 Intensidade de EROs pelos granulócitos em Q4

A intensidade de produção de EROs, realizada pelos granulócitos classificados na subpopulação Q4 (que não estavam fagocitando SaPI, mas estavam produzindo EROs), apresentou diferença no grupo Vitamina E, em que os valores de M5 foram maiores que os apresentados em M6 ($p < 0,001$), como pode ser verificado no Gráfico 23. O Gráfico 24 evidencia que na avaliação do conjunto de 26 animais, não foi possível observar diferenças entre os momentos.

Gráfico 23 - Comparação entre os grupos Vitamina E e Controle, ao longo do período de estudo (de M1 à M8), a partir dos valores de mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos da subpopulação Q4 [EROS(+) e SaPI(-)].

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs Q4 (EROS + e SaPI-) = Intensidade da produção de EROs, dos granulócitos que não fagocitaram SaPI. As diferenças entre os momentos, foram identificadas por letras distintas.

Gráfico 24 - Mediana e IIQ da intensidade de produção de EROs pelos granulócitos da subpopulação Q4 [EROS(+) e SaPI(-)], de todos os animais (n=26), ao longo do período de avaliação (de M1 à M8).

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Intens. EROs Q4 (EROS + e SaPI-) = Intensidade da produção de EROs, dos granulócitos que não fagocitaram SaPI.

Costa et al. (2017) relataram uma máxima intensidade de produção de EROs aos 21 dias em bezerras holandesas. Provavelmente, esses valores foram obtidos utilizando a somatória dos valores verificados nas intensidades de produção de EROs, em Q2 e Q4 (células produzindo EROs, independente da fagocitose de SaPI). No presente trabalho os valores mais altos desta intensidade foram encontrados, em Q4, aos 35,35 ($\pm 2,64$) dias de vida dos bezerros do grupo Vitamina E. Em Q2, esta intensidade apresentou maiores valores aos 14,35 ($\pm 2,64$) dias de vida dos bezerros, seguida de um declínio, para os animais dos grupos Vitamina E e Controle. Por sua vez, Batista et al. (2015) encontraram intensidade constante de produção de EROs, por células mono- e polimorfonucleares, em bezerros holandeses da primeira semana até os 90 dias de vida.

Segundo Costa et al. (2017), os valores mais baixos nas porcentagens de granulócitos, em determinados momentos, poderiam ser justificados por uma alta eficiência destas células na produção de H_2O_2 .

5.3.2.5 Considerações sobre a dinâmica das quatro subpopulações de granulócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4).

As porcentagens de granulócitos presentes em cada uma das subpopulações são proporcionais. As porcentagens de células fagocitando SaPI, no entanto, não produzindo EROs (classificadas em Q1) mantiveram-se constantes durante todo o experimento, alcançando cerca de 50% dos granulócitos. As porcentagens de granulócitos em Q2 (granulócitos que fagocitaram SaPI e produziram EROs) atingiram entre 30% e 40% dos granulócitos e apresentaram diminuição nas últimas semanas de avaliação. Por sua vez, as porcentagens destas células em Q4 (granulócitos que não fagocitaram SaPI, porém produziram EROs) atingiram cerca de 5 a 20% dos granulócitos e apresentaram aumento nas últimas semanas. As porcentagens de granulócitos que não estavam fagocitando SaPI nem produzindo EROs (classificados em Q3), apesar de pequenas, apresentaram-se maiores na

primeira semana de vida dos animais, seguida de grande diminuição e estabilidade nos momentos seguintes.

Maiores porcentagens de granulócitos classificados em Q3 na primeira semana de vida dos bezerros, poderiam ser responsáveis pela menor porcentagem total de granulócitos produzindo EROs, neste mesmo período, sem o estímulo pela fagocitose de SaPI. Por sua vez, o aumento da intensidade de produção de EROs, ocorrido na segunda semana de vida, aconteceu tanto nos granulócitos fagocitando (Q2) quanto naqueles que não estavam fagocitando SaPI (Q4). Assim, os animais com idade média de 14,35 ($\pm 2,64$) dias podem ter apresentado maior capacidade de produção de EROs, devido ao maior desafio imunológico que sofreram os bezerros, causado pela exposição a agentes externos que estimulariam a ação de células imunes para defesa do organismo.

Acompanhando essa maior intensidade de produção de EROs pelos granulócitos na segunda semana de vida dos bezerros Wagyu, houve, uma maior intensidade de fagocitose de SaPI. No entanto, este aumento da fagocitose foi mais evidente em células que não produziram EROs.

Roitt, Brostoff e Male (1985) afirmaram que há uma maior dificuldade de realização da fagocitose em bezerros neonatos, devido a uma menor produção de opsoninas por estes animais, moléculas que agem como facilitadoras de ligação no processo de fagocitose, revestindo os microrganismos e aumentando a capacidade de engolfamento pelos fagócitos. A produção destas opsoninas aumenta conforme a idade e maturação do sistema imunológico.

A intensidade de fagocitose realizada pelos granulócitos demonstrou aumento nas últimas semanas de avaliação em Q1 e Q2, inversamente ao observado com a intensidade de produção de EROs por estas células em Q2, que apresentaram diminuição ao final dos 60 dias de avaliação.

Assim, foi possível observar que, nos bezerros da Raça Wagyu avaliados, houve, ao final dos 60 dias de vida, um aumento da intensidade de fagocitose, porém, uma diminuição da produção de EROs pelos granulócitos. Considerando o sugerido por Costa et al. (2017), é possível que uma maior capacidade de fagocitose pelos granulócitos seja acompanhada de uma menor necessidade de produção de EROs pelas mesmas para manter sua eficiência.

5.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O EFEITO VITAMINA E

No presente trabalho, não foram observadas diferenças entre os grupos Controle e Vitamina E em nenhum dos parâmetros avaliados no exame físico e em exames complementares (hemograma, bioquímica sérica e função de neutrófilos). A semelhança entre os grupos pode ser atribuída à baixa dosagem de Vitamina E utilizada, insuficiente para que se pudesse provocar alterações nos parâmetros avaliados.

Higuchi et al. (2013), descreveram que, para bezerros da raça Holandesa, a dose de 25 UI/kg de Vitamina E foi capaz de causar interação com neutrófilos sanguíneos, ultrapassando as camadas externas destas células e possibilitando sua utilização. No entanto, os autores não avaliaram a função dos neutrófilos, pois o delineamento do estudo foi realizado para a identificação dos genes responsáveis pela interação da Vitamina E com este tipo celular. O presente trabalho utilizou dosagens próximas à usada pelo autor (30 UI/kg), no entanto, não foi possível evidenciar alteração da função dos neutrófilos em bezerros da raça Wagyu.

Haga et al. (2015), utilizaram a dosagem de 30UI/kg de Vitamina E, conseguindo evidenciar interação com linfócitos em diferentes tecidos de bezerros Wagyu, porém, sem estabelecer as consequências da ação da Vitamina E sobre estas células. De forma semelhante, Otomaru et al. (2015) relataram ação da Vitamina E sobre os leucócitos, aumentando a contagem total destas células no sangue periférico, com consequente melhoria da imunidade de bezerros Wagyu. No entanto deve ser ressaltado que esses autores utilizaram dosagens dez vezes mais altas da Vitamina E (300 UI/Kg). Resultados de outras pesquisas também relataram melhora da imunidade geral de bezerros contra afecções, utilizando dosagens mais altas de Vitamina E, como aquela de Bednareck, Kondracki e Cakala (1996), que sugerem a dose de 75 mg/kg. No entanto, Aberts et al. (2002) propuseram a utilização de dosagem mais baixa (150 a 200 mg/100Kg) para a mesma finalidade. Entretanto, não evidenciaram as consequências da ação da Vitamina E, especificamente sobre as células responsáveis pela imunidade dos bezerros.

Segundo Smith et al. (1984), a ação da Vitamina E é dependente da sua interação com o Selênio (Se) e para Lucci (1997) a distribuição de Se nos solos é desigual entre diferentes regiões do país. De acordo com este último autor, a região do Estado de São Paulo, onde se realizou o presente trabalho, possui baixas quantidades de Se no solo e nos pastos. Portanto, a suplementação com a Vitamina E somente surtiria efeito com um fornecimento paralelo de Se. Os bezerros suplementados no presente trabalho podem ter recebido baixas quantidades de Se através do leite de suas mães, que, por sua vez, apesar de receberem suplementação com sal mineral, podem receber baixos teores de Se do pasto. A ausência de suplementação de Se, junto à Vitamina E, dos bezerros Wagyu avaliados, pode ser uma das causas da igualdade entre os grupos Controle e o com Vitamina E.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos a respeito do metabolismo do gado Wagyu, com enfoque principal na melhoria da qualidade e sabor da carne, alimentação e elucidação do processo de marmoreio de gordura entre as fibras musculares destes animais. Porém, em comparação com a raça bovina Holandesa, ainda é escassa a literatura sobre a imunidade dos bezerros Wagyu, suas peculiaridades e necessidades perante a criação comercial. Este fato dificulta o desenvolvimento de algumas pesquisas exclusivamente com esta raça bovina. Portanto, há necessidade de desenvolvimento de mais estudos sobre a saúde dos bezerros Wagyu, para que se possa entender melhor os mecanismos de defesa contra as principais afecções que os acometem e também, auxiliar em mudanças de manejo que melhorem a qualidade de vida desses animais.

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, em relação à avaliação da função de neutrófilos de bezerros da raça Wagyu durante os dois primeiros meses de vida, suplementados com dose única de Vitamina E injetável (30UI/kg), permitiu as seguintes conclusões:

- Os bezerros da raça Wagyu apresentaram valores e comportamentos obtidos no exame físico (ganho de peso, funções vitais e turgor de pele), leucograma e bioquímica sérica semelhantes aos descritos na literatura para outras raças de bovinos.
- O eritrograma dos bezerros Wagyu apresentou possíveis diferenças em relação aos valores colhidos na literatura, para outras raças bovinas.
- A aplicação de Vitamina E em dose única de 30UI/kg não promoveu alteração na função dos neutrófilos, a partir da avaliação da produção de EROs pelos granulócitos, estimulados ou não pela fagocitose de SaPI, bem como em relação a esta fagocitose.
- Existe a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas à respeito de dosagens de Vitamina E, bem como acerca da suplementação concomitante com Selênio, capazes de gerar alterações na função de neutrófilos dos bezerros Wagyu, ou possível melhora do perfil imunitário destes animais.

REFERÊNCIAS

ABCWAGYU. Associação Brasileira dos criadores de Bovinos da Raça Wagyu, **Histórico da raça Wagyu**, São Paulo 2017. Disponível em: <<http://www.wagyu.org.br/sobre-a-raca-wagyu/historico-genetica-especial-do-japao/>, 2017>. Acesso em 22 de abr 2017.

AWA 2017. American Wagyu Association, **What is Wagyu**. Disponível em: <<http://wagyu.org/breed-info/what-is-wagyu/>>, 2017. Acesso em 22 de abr 2017.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 3 ed. Philadelphia, W. B. Saunders, p. 494, 1997

ADAMS, R.; GARRY, F. B.; ALDRIDGE, B. M.; HOLLAND, M. D.; ODDE, K. G., Hematologic values in newborn beef calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n. 6, p. 944-950, 1992.

ALBERTS, N.; GOTTERBARM, G.; HEIMBECK, W.; KELLER, T.; SEEHAWER, J.; TRAN, T.D. **Vitamins in animal nutrition**. 1 ed. AWT, Agrimedia, Bonn, Alemanha, p. 9-15, 45-59. 2002.

AZEDO, M.R. **Influência da Leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos**. 2007. 154 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BACH, A.; AHEDO, J.; FERRER, A. Optimizing weaning strategies of dairy replacement calves, **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 1, p.413–419, 2010.

BADWEY, J.A.; KARNOVSKY, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annual Review of Biochemistry**. v.49, p.695, 1980.

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.

BARTON, C.R.; ALLEN, W.M. Possible paralytic myoglobinuria of unknown actiology in young cattle. **Veterinary Record**. v. 92, p. 288, 1973.

BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.

BATISTA, C.F.; BLAGITZ, M.G.; BERTAGNON, H.G.; GOMES, R.C.; SANTOS, K.R.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Evolution of phagocytic function in monocytes

and neutrophils blood cells of healthy calves, **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, 8882–8888, dez, 2015.

BEDNAREK, D.; KONDRACKI, M.; CAKALA, S. Effect of selenium and vitamin E on white cells, serum concentration of several minerals and trace elements as well as immunologic parameters in calves. **Deutsch Tieraztl Wochenschr**, v.103, n.11, p. 457-9, novembro, 1996.

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

BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BOHLAND, E.; MIRANDOLA, R.M.S. Eritrograma de bezerros sadias da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n.4, p. 357-360, 2012a.

BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA, R. M. S.; SHECAIRA, C. L.; GOMES, V. Leukogram of healthy Holstein calves within the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 352-356, 2012b.

BIRGEL, E.H., Hematologia Clínica Veterinária, p.2-49. In: Birgel E.H. & Benesi F.J. (Eds), **Patologia Clínica Veterinária**. Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo, p. 260, 1982

BRANDT, R.; KESTON, A.S. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: a stable reagente for fluorometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v.11, n. 1, p 6-9, 1965.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em <www.agricultura.gov.br>. Acesso em 9 Jan 2017.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.

CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro. Revinter Ltda. 2009. p 323.

CHOW, CK. Effect of dietary selenium and vitamin E on the antioxiant defense systems of rat erythrocytes. **International Journal Vitamin and Nutrition Research**, v. 2, p.182-195, 1979.

CHRISTOPHER, C.L.; CHASE, D.V.M.; HURLEY, D. J.; ADRIAN, J.R. Neonatal imune development in the Calf and its impact in vaccine response, **Veterinary clinic of food animals**, v. 24, p. 87-104, 2008.

COELHO, M.B. **Vitamin E in Animal Nutrition and Management**. A BASF Reference Manual. BASF Corporation. 1 ed. p. 1-195. 1991.

CORTESE, V. S. Neonatal immunology, **Veterinary Clinic of Food Animals**, v. 25, p. 221–227, mar, 2009.

COSTA, J. F. R.; NOVO, S. M. F; BACCILI, C. C.; SOBREIRA, N. M.; HURLEY, D. J.; GOMES, V., Innate immune response in neonate Holstein heifer calves fed fresh or frozen colostrum. **Research in Veterinary Science**. v. 115, p. 54–60, 2017.

DANIELS, L. B.; KELLOGG, D. W.; HARRISON, K. F. Effect of supplementing dairy cows and heifers with selenium and vitamin E, **Journal of Dairy Science**, v.70, n. 1, p. 202, 1987.

DE PAULA VIEIRA, A.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; WEARY, D. M. Effects of pair versus single housing on performance and behavior of dairy calves before and after weaning from milk. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 3079–3085, 2010.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. Rosenberger - Exame clínico dos bovinos. In: DIRKSEN, G. **Sistema digestivo**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 166-228. 1993.

DROUCHNER, W. **Current status of vitamin E research presented on the example of the vitamin E requirements and supply status of the pig**. Basel: Hoffmann-La Roche. p.93, 1976.

EGER, S.; DRORI, D.; KADOORI, I.; MILLER, N.; SCHINDLER, H., Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 8, p. 2119, 1985.

ENGSETH, N.J.; GRAY, J.I.; BOOREN, A. M.; ASGHAR, A. Improved Oxidative Stability of Veal Lipids and Cholesterol through Dietary Vitamin E Supplementation. **Meat Science**. v. 35, 1 - 15, England, 1993.

FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalis bubalus*) raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 253-262, 1998.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H.; MIRANDOLA, R. M. S.; PERRI, S. H. V. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 251- 255, 2001.

FEITOSA, F. L. F. **Dinâmica do proteinograma e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo de bezerros desde o**

nascimento até um ano de vida e de vacas antes e após o parto, da raça Holandesa. 1998. 219 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

FEITOSA, F. L.; BENESI, F. J. Semiologia de Animais Recém-nascidos. In: FEITOSA, F. L. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 3. ed. São Paulo. Roca, p. 69-97, 2014.

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.

FELDMAN, B. C.; ZINKIL, J.G.; JAIN, M. C. **Veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1344, 2000.

FINCH, J. M.; TURNER, R. J. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals - **Research in Veterinary Science**, v. 60, p. 97-106, 1996.

GOLUB, M.S. e GERSHWIN, M.E., Stress-induced immunomodulation: what is it, if it is? In “Animal Stress”, G.P. Moberg, ed. **American Journal of Physiologic Societ**, Bethesda, Maryland, p. 114. 1985.

GOTOH, T.; JOO, S.T. Characteristics and Health Benefit of Highly Marbled Wagyu and Hanwoo Beef, **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**. v. 36, n. 6, p. 709-718, dez, 2016.

GUO, Y.; ZHANG, X.; HUANG, W.; MIAO, X. Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in subcutaneous adipose between Wagyu and Holstein cattle. **Science Republic**, v. 8, n. 7, p. 44026, mar, 2017.

GRASSO, P. J.; SCHOLZ, R. W.; ERSKINE, R. J.; EBEHART, R. J. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, p. 269-274, 1990.

GYANG, E.O.; STEVENS, J.B.; OLSON, W.G.; TSITSAMIS, S.D.; USENIK, E.A. Effects of selenium-vitamin E injection of bovine polymorphonucleated leukocytes phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. **American Journal of veterinary Research**, v. 45, p. 175-177, 1984.

HAGA, S.; NAKANO, M.; ISHIZAKI, H.; ROH, S.G.; KATOH, K. Expression of α -tocopherol-associated genes and α -tocopherol accumulation in Japanese Black

(Wagyu) calves with and without α -tocopherol supplementation. **Journal of animal Science**. v. 93, p. 4048–4057, ago, 2015

HARRISON, J. H.; HANCOCK, D. D.; CONRAD, H. R. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. **Journal of Dairy Science**. v. 67, n. 1, p. 123-132, 1984.

HIDIROGLOU, M. Mammary Transfer of Vitamin E in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. v. 72, n. 4, p. 1067-1071, 1989.

HIDIROGLOU, M.; BATRA T. R.; ZHAO, X. Bioavailability of vitamin E compounds and the effect of supplementation on release of superoxide and hydrogen peroxide by bovine neutrophils, **Journal of Dairy Science**. v. 80, p. 187–193, fev, 1995.

HIDIROGLOU, M.; HOFFMAN, J.; JENKINS, K.J. Selenium distribution and radiotocopherol metabolism in the pregnant ewe and fetal lamb. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 47, n. 11, p. 953, 1969.

HIDIROGLOU, M.; LESSARD, J.R.; WAUTHY, J.M. Blood serum tocoferol levels in calves born from cows winter fed hay or glass silage. **Canadian Journal of Complementary Medicine**. v. 42, jan, 1978.

HIGUCHI, H.; ITO, E.; IWANO, H.; OIKAWA, S.; NAGAHATA, H. Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. **Canadian Journal of Veterinary Journal**. v. 77, n. 2, p. 120-5, abr, 2013.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.A. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.82, n. 2, p. 253-259, 1985.

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

HOFFMANN-LA ROCHE. **Vitamin E for Ruminants**. RCD. Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey. v. 191, p. 8361. 1991.

HOGAN, J. S. Role of vitamin E and selenium in host defences against bovine mastitis. In Ed Hogan J. **The Alvin Lloyd Moxon Honorary Lectures on Selenium and vitamin E**. p. 70-76, 1999.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; WEISS, W. P.; TODHUNTER, D. A.; SCHOCKEY, W. L. Relationships among vitamin E, selenium and bovine blood neutrophils. **Journal of Dairy Science**. v. 73, n. 9, p. 2372–2378, 1990.

HOLMAN, H. H. Changes associated with age in the blood picture of calves and heifers. **British Veterinary Journal**. v. 112, p. 91-104, 1956.

HUSBAND, A. J.; BRANDON, M. R.; LASCELLES, A. K. Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**. Adelaide, v. 50, n. 1-2, p. 81-89, 1972

HUTCHINSON, L. J.; SCHOLZ, W.; DRAKE, T. R. Nutritional myodegeneration in a group of Chianina heifers. **Journal American Veterinary Medicine Association**. v. 181, n. 6, p. 581, 1982.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e estatística**, 2015. Disponível em: <<http://brasilemsintese.ibge.gov.br/agropecuaria/efetivos-da-pecuaria.html>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

LUCCI, C.S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. 1 ed. São Paulo. Manole Ltda. p. 91-93. 1997.

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

KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J. A.; FRANK, D. E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.97, n.1-2, p.105-114, 2004a.

KAMPEM, A.H.; TOLLERSRUD,T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47-55, 2004b

KANEKO, J. J.; HARHEY, I. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press. p. 932. 1997.

KANEKO J. J.; MILLS R., Hematological and blood chemical observations in neonatal normal and porphyric calves in early life. **Cornell Veterinary**, v. 60, n. 1, p.52-60. 1970.

KING, R. L.; BURROWS, F. A.; HENKEN, R. W.; BASHORE, D.L. Control of oxidized flavor by managed intake of vitamin E from selected forages. **Journal of Dairy Science**. v. 50, p. 943-944, 1967.

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

MAAS, J.; HOAR B. R.; MYERS, D. M.; TINDALL, J.; PUSCHNER, B., Vitamin E and selenium concentrations in month-old beef calves, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 20, n. 1, p. 86–89, jun, 2008

MACHADO NETO, R.; FARONI, C. E.; PAULETTI, P.; BESSI, R. Levantamento do manejo de bovinos leiteiros recém-nascidos: desempenho e aquisição de proteção passiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2323-2329, 2004.

MACHLIN, L. J. Vitamin E, em MACHLIN, L. J. 1 ed. **Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects**. New York . Marcel Dekker Inc. p. 99-145, 1984.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. 1 ed. San Diego, CA. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. 1992.

MCCOY JR, J. P. **Basic principles in clinical flow cytometry**. In: KEREN, D.F.; HANSON, C.A.; HURTUBISE, P.E. (Ed.). Flow cytometry and clinical diagnosis. 4 ed. Chicago. American Society of Clinical Pathologists. p. 26-55, 1994.

MOKHBER-DEZFOULI, M. R.; RAHIMIKIA, E.; ASADI, F.; NADALIA, M. G. The Role of Route of Vitamin E Administration on the Plasma Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation in Newborn Calves. **Journal Compilation Nordic Pharmacological Society, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 103, n.1, 414–418, janeiro, 2008

MOTOYAMA, M.; SASAKI, K.; WATANABE, A. Wagyu and the factors contributing to its beef quality: A Japanese industry overview. **Meat Science**. v. 120, p. 10-8, out, 2016.

MUTH, O.H. White muscle disease (myopathy) in lambs and calves: Occurrence and nature of the disease under Oregon conditions. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 126, p. 355, 1955.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient Requirements of Domestic Animals: Nutrient Requirements of Poultry**, 8. ed. National Academy of Sciences, Washington, D.C.: NRC. 1984.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Vitamin Tolerance of Animals**. National Academy of Sciences. Washington, D.C.: NRC. 1987

NAYLOR, J. M.; KRONFELD, D. S.; BECH-NIELSEN, S.; BARTHOLOMEW, R. C. Plasma total protein measurement for prediction of disease and mortality in calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 171, p. 635-638, 1977.

NOCKELS, C.F. Vitamin E requirement of beef cattle: Influencing factors. **BASF Technical Symposium**, Bloomington, Minnesota, p.40, 1991.

NOVO, S. M. F.; FREITAS, R. L.; SILVA, C.P.C.; BALDACIM, V.A.P.; BACCILI, C.C.; REIS, J.F.; HAGIWARA, M.K.; GOMES, V. Hematological adaptation in Holstein calves during the neonatal period. **Brazilian Journal Veterinary Resert Animal Science**. São Paulo, v. 52, n. 3, p. 212-216, 2015.

OHTSUKA, H.; ONO, M.; SARUYAMA, Y.; MUKAI, M.; KOHIRUIMAKI, M.; KAWAMURA, S. Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves. **Animal Science Journal**. v. 82, 93-98, 2011a.

OHTSUKA, H.; MUKAI, M.; TANAMI, E.; TOKITA, M.; HASHIBA, Y.; KOHIRUIMAKI, M.; SHIBANO, K.; MIURA, K.; MORRIS, S. Relationship between diarrhea and peripheral leukocyte population in neonatal Japanese Black Calves. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 73, n. 11, p. 1477-1479, jun, 2011b.

OHTSUKA, H.; FUKUNAGA, N.; FUKUDA, S.; HATSUGAYA, A.; HAYASHI, T.; HARA, H.; KOIWA, M.; ABE, R.; KAWAMURA, S. Effect of nutritional conditions on changes in leukocyte populations in Japanese black calves. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 67, n. 2, p. 183-185, 2005

ORTOLANI, E.; Portal DBO, Fatos e Causos Veterinários, **Mortalidade de bezerros deveria ser metade do que é**. 2016. Disponível em: <<http://www.portaldbo.com.br/Revista-DBO/Destaques/Mortalidade-de-bezerros-deveria-ser-metade-do-que-e/18388>>. Acesso em 10 abr. 2017.

OTOMARU, K.; SAITO, S.; ENDO, K.; KOHIRUIMAKI, M.; FUKUYAMA, S.; OHTSUKA, H. Effect of Supplemental Vitamin E on Antibody Titer in Japanese Black Calves Vaccinated against Bovine Herpesvirus-1. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 75, n. 12, p. 1671–1673, 2013.

OTOMARU, K.; SAITO, S.; ENDO, K.; KOHIRUIMAKI, M.; OHTSUKA, H. Effect of supplemental vitamin E on the peripheral blood leukocyte population in Japanese Black calves. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 77, n. 8, p. 985–988, 2015.

PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Resources**. v. 34, n. 5, p. 597–627, 2003.

PARISH, S. M.; TYLER, J. W.; BESSER, T. E.; GAY, C. C.; KRYTENBERG, D. Prediction of serum IgG1 concentration in Holstein calves using serum gamma glutamyltransferase activity. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 11, n. 6, p. 344-347, 1997.

PEKMEZCI, D.; CAKIROGLU D. Investigation of Immunomodulatory effects of levamisole and vitamin E on Immunity and some blood parameters in newborn Jersey calves. **Veterinary Resources Commun**. v 33, n. 7, p. 711–721, abr, 2009.

QUIGLEY, J. Calf age, total protein and FPT in calves. **Calf notes.com**, n. 62, 2001. Disponível em: <<http://www.calfnotes.com/pdf/CN062.pdf>> Acesso em:14, jun, 2017.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p. 56-59. 2002.

REA, D. E.; TYLER, J. W.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; WILSON, L. KRYTENBERG, D. S.; SANDERS, S. G. Prediction of calf mortality by use of tests for passive transfer of colostral immunoglobulin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 208, p. 2047-2049, 1996.

REDDY, P.G.; MORRILL, J.L.; FREY, R.A.; MORRILL, M.B.; MINOCHA, H.C.; GALITZER, S.J.; DAYTON, A.D. Effects of supplemental vitamin E on performance and metabolic profiles af dairy calves. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p. 2259, 1985.

REDDY, P.G.; MORRILL, J.L.; MINOCHA, H.C.; STEVENSON, J.J. Vitamin E is immunostimulatory in calves. **Journal of Dairy Science**. v. 70, p. 993, 1987.

ROARK, C. L.; SIMONIAN, P. L.; FONTENOT, A. P.; BORN, W. K.; O'BRIEN, R. L. Gammadelta T cells: an important source of IL-17. **Current Opinion in Immunology**. v. 20, n. 3, p. 353-357, 2008.

ROCHA, T. G.; NOCITI, R. P.; SAMPAIO, A. A. M.; FAGLIARI, J .J. Hemograma e proteínas de fase aguda de bezerros sadios do nascimento aos 30 dias de idade. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 33, n. 1, 25-31, dez, 2013.

ROCHA, T. G.; NOCITI, R. P.; SAMPAIO, A. A. M.; FAGLIARI, J .J. Passive immunity transfer and serum constituents of crossbred calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 6, p. 515-522, 2012.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. **Immunology**. 2 ed. London. Gower Medical. p.552, 1985.

ROQUET, J.; NOCKELS, C.F.; PAPAS, A.M. Cattle Blood Plasma and Red Blood Cell a-Tocopherol Levels in Response to Different Chemical Forms and Routes of Administration of Vitamin E. **Journal of Animal Science**. p.2542-2550, mar, 1992.

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.

SCOTT, M.L.; NESTHEIM, M.C.; YOUNG, R.J. Nutrition of the chicken, **ML Scott and associates publishers**. Ithaca, Nova York. p. 119. 1982.

SEINO, C.H. **Problemas umbilicais em bezerros nos primeiros 30 dias de vida: avaliação clínica ultrassonográfica e correlação com a transferência de imunidade passiva**. Dissertação (Mestrado em ciência animal). 100 f. 2014. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-22, 2004.

SILVEIRA, L.R. **Determinação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico através de sondas fluorescentes in vitro utilizando culturas de células musculares e músculos isolados e sua aplicação in vivo com a técnica de microdiálise**. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003

SINGH, A. K.; PANDITA, S.; PAMPOORI, Z.A.; HUOZHA, R.; ASHUTOSH, M. Effect of pre-partum supplementation of vitamin E to Murrah buffaloes on immune functions and viability of calves. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 255–262. 2013.

SMITH, K.L.; HARRISON, J.H.; HANCOCK, D.D.; TODHUNTER, D.A.; CONRAD, H.R. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1293-1300. 1984.

SMITH, S.E. Vitamins. In **Duke's Physiology of Domestic Animals**, M.J. Swenson, ed.1. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1970.

SWAIN; KUSHWAH, M.S.; KAUR, M.; DANG, A.K. Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 336-345, mar, 2015.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária. 2 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 729. 2011.

SWECKER JR, W.S.; HUNTER, K.H.; SHANKLIN, R.K.; SCAGLIA, G.; FISKE, D.A.; FONTENOT, J.P. Parenteral Selenium and Vitamin E Supplementation of Weaned Beef Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 443–449, 2008.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. USA. Lippincott Williams & Wilkins, p.403-411, 2004.

TOLLERSRUD, S., Changes in the enzymatic profile in blood and tissues in pre-clinical and clinical vitamin E deficiency in pigs. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 19, p. 124, 1973.

TSUSHIDA, S.; YAMADA, Y.; FUKUI, E.; KAWADA, T.; OMI, T.; TSUSHIDA, A.; SAKO, T.; HATAKEYAMA, H.; KOTANI, K. Distribution of single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and association with calf diseases in

Japanese Black Cattle. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 72, n. 12, p. 1609-1614, ago, 2010.

TYLER, J. W.; PARISH, S. M.; BESSER, T. E.; VAN METRE, D. C.; BARRINGTON, G. M.; MIDDLETON, J. R. Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically ill calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 1, p. 40–43. 1999.

VETTORATO, E. D.; COSTA, M. C.; FLAIBAN, K. K. M. C.; VIDOTTO, O.; BALARIN, M. R. S.; LISBÔA, J. A. N. Variação de proteínas séricas em bezerros das raças nelore e holandesa do nascimento até os seis meses de vida. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 3181-3190, Suplemento 2, 2012.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VANMETRE, D. C.; HOSTETLER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n. 6, p. 569–577, 2000.

WELCH, H.; MAURAN, C.; MARIDONNEAU - PARINI, I.I. Nonreceptor protein-tyrosine kinases in neutrophil activation. **Methods**, v.9, n.3, p. 607-618, 1996.

WHATELY, M. **Carne de Wagyu, conheça mais este mercado de carne bovina premium com alto marmoreio**. 2012. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/entrevistas/carne-bovina-wagyu-premium-mercado-marmoreio/>>. Acesso em: 15, mar, 2017.

YONESAKA, R.; SASAZAKI, S.; YASUE, H.; NIWATA, S.; INAYOSHI, Y.; MUKAI, F.; MANNEN, H. Genetic structure and relationships of 16 Asian and European cattle populations using DigiTag2 assay. **Animal Science Journal**. v. 87, n. 2, p. 190–196, 2016.

APÊNDICE A

Tabela 16 - Resultado dos exames físicos dos animais dos grupos Controle (Cont) e Vitamina E (Vit E), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo Média e DP para Frequência cardíaca e Mediana e IIQ para os demais dos parâmetros estudados

Momentos	Frequência cardíaca		Frequência respiratória		Temperatura retal		Turgor de pele	
	Média	DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Cont M1	154,31	18,47	52	24	39,3	0,6	2"	0
Cont M2	148,92	16,18	44	21	39,0	0,5	1"	1
Cont M3	145,23	25,00	44	22	39,2	0,5	2"	1
Cont M4	148,69	25,02	48	22	39,4	0,9	1"	1
Cont M5	134,15	27,55	36	20	39,1	0,5	2"	1
Cont M6	122,46	21,33	40	10	39,1	0,3	2"	1
Cont M7	122,00	19,53	40	50	39,3	0,7	1"	0
Cont M8	128,31	30,31	28	14	38,4	0,6	1"	0
Vit E M1	144,00	29,98	44	16	40,0	1,0	2"	1
Vit E M2	141,54	18,66	40	20	39,5	0,6	1"	1
Vit E M3	127,85	18,48	44	21	39,1	0,6	1"	1
Vit E M4	151,62	22,00	40	16	39,5	0,5	1"	1
Vit E M5	123,85	15,59	28	14	39,4	0,6	1"	1
Vit E M6	125,85	21,95	36	10	39,2	0,7	1"	0
Vit E M7	120,62	17,88	36	18	39,2	0,7	1"	0
Vit E M8	119,85	15,50	24	17	39,3	0,7	2"	1

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Frequência cardíaca (batimentos por minuto); Frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto); Temperatura retal (°C); Turgor de pele [em segundos (")]. Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35.

APÊNDICE B

Tabela 17 - Resultado dos exames físicos de todos os animais (n=26), ao longo do período de estudo (de M1 à M8), sendo Média e DP para Frequência cardíaca e Mediana e IIQ para os demais dos parâmetros avaliados

Momentos	Frequência cardíaca		Frequência respiratória		Temperatura retal		Turgor de pele	
	Média	DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
M1	149,15	24,96	48	20	39,5	1,0	2"	1
M2	145,23	17,52	40	20	39,0	0,0	1"	1
M3	136,54	23,29	44	21	39,0	1,0	2"	1
M4	150,15	23,13	48	12	39,0	1,0	1"	1
M5	129,00	22,55	32	17	39,0	0,3	1"	1
M6	124,15	21,27	40	8	39,0	0,0	1"	1
M7	121,31	18,36	36	21	39,0	1,0	1"	0
M8	124,08	23,98	25	16	38,0	1,0	1"	1

Fonte: (WEISS, E. C., 2017)

Legenda: Frequência cardíaca (batimentos por minuto); Frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto); Temperatura retal (°C); Turgor de pele [em segundos (")]. Considerando a idade média, em dias, dos animais em cada momento: M1=7,35, M2=14,35, M3=21,35, M4=28,35, M5=35,35, M6=42,35, M7=49,35, M8=56,35.