SYLVIA MARQUART FONTES NOVO

**Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune
de bezerros recém-nascidos**

São Paulo

2015

SYLVIA MARQUART FONTES NOVO

**Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune
de bezerros recém-nascidos**

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Viviani Gomes

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3165
FMVZ

Novo, Sylvia Marquart Fontes
Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune de bezerros recém-nascidos / Sylvia Marquart Fontes Novo. -- 2015.
128 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Viviani Gomes.

1. Bovinos. 2. Células mononucleares. 3. Imunidade passiva. 4. Neonatos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune de bezerros recém-nascidos”, protocolado sob o nº 2934/2013, utilizando 20 (vinte) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Viviani Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research “Effect of leukocytes colostrum mother in immune response of newborn calves”, protocol number 2934/2013, utilizing 20 (twenty) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Viviani Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NOVO, Sylvia Marquart Fontes

Título: **Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune de bezerros recém-nascidos**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus. Aos meus pais pelo amor incondicional. Ao meu irmão pela amizade verdadeira. E a minha orientadora vitoriosa e grande amante da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me dar força nos momentos difíceis e pela paz e amor em todos os dias da minha vida. Aos meus pais, Jorge Rodrigues Fontes Novo e Marly Elsitá Marquart Fontes Novo por todo amor, companheirismo e compreensão por diversos momentos que não pude estar com eles e apoio financeiro que foi essencial para realizar mais este sonho. Ao meu irmão, Marcelo Jorge Marquart Fontes Novo pela amizade verdadeira, por me apoiar nas minhas escolhas e sempre estar ao meu lado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Viviani Gomes pela confiança e estímulo para sempre buscarmos o melhor resultado, independente dos esforços, nos ensinando a focar no futuro e ver que aquilo tudo um dia valeria a pena. Nos demonstrando isso em seu dia a dia, onde, mesmo ela, chegando onde já chegou, continua lutando por mais e mais conhecimentos e conquistas pessoais. Uma grande vitoriosa! Muito obrigada!

Ao ilustre diretor da FMVZ/USP Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani e aos admirados professores do Departamento de Clínica Médica: Prof^a Dr^a Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Prof^a Dr^a Carla Bargi Belli, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Prof^a Dr^a Denise Saretta Schwartz, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Prof^a Dr^a Lílian Gregory, Prof^a Dr^a Márcia de Oliveira Sampaio Gomes, Prof^a Dr^a Marcia Mery Kogika, Prof^a Dr^a Maria Cláudia Araripe Sucupira, Prof^a Dr^a Maria Helena Matiko Akao Larsson, Prof^a Dr^a Mitika Kuribayashi Hagiwara, Prof^a Dr^a Raquel Yvona Arantes Baccarin, Prof^a Dr^a Silvia Regina Ricci, Prof^a Dr^a Viviani Gomes e Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.

Em especial, à Prof^a Dr^a Alice Maria Melville Paiva Della Libera e toda sua equipe pelos materiais emprestados, auxílio, carinho e amizade! À Prof^a Dr^a Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes pelos conhecimentos transmitidos do citômetro, FlowJo e por nos emprestar o leitor de ELISA quando precisamos. Ao Prof. Dr.

Fernando José Benesi pelos ensinamentos e por fazer parte da minha formação. Ao Prof Dr Fábio Celidonio Pogliani e toda sua equipe pelos ensinamentos e amizade! À Profª Drª Karina Medici Madureira pela grande ajuda e ensinamentos durante o mestrado! À Profª Drª Mitika Hagiwara pelos ensinamentos! A senhora é um grande exemplo a ser seguido! Muito obrigada por fazer parte da minha formação! Ao Prof Dr Nilson Roberti Benites por nos ter gentilmente cedido as bactérias para realização deste experimento. Ao Prof Dr Paulo Brandão por ter nos emprestado seu laboratório e estufa quando precisamos.

Ao Prof. Dr. David John Hurley, da "The University of Georgia" por nos transmitir várias de suas técnicas e conhecimentos desde a confecção da ideia deste trabalho até a discussão dos resultados! Obrigada por nos receber em sua Universidade e casa! O senhor e sua família são pessoas admiráveis! Muito obrigada!

À Profª. Drª Camila Infantsi Vannucchi e Profª. Drª Carla Maris Bittar por terem aceitado o convite para ser banca desta dissertação e contribuírem com seus conhecimentos.

À duas professoras especiais, Profª. Denise de Freitas Sacco, que me acompanhou até o colegial e Profª. Drª. Erika C. T. de Mello Peixoto e toda sua equipe, por me introduzirem no mundo da pesquisa e despertarem em mim o amor pela busca ao conhecimento!

Aos colegas de equipe: Camila Costa Baccili sempre querida, muito obrigada de coração pela ajuda durante o experimento! Bruno Toledo Silva meu parceiro desde as iniciações científicas, muito obrigada pela ajuda na fazenda durante o experimento e companheirismo! Juliana França dos Reis, uma guerreira, exemplo de força, com você aprendi uma outra forma de enfrentar os obstáculos da vida! Vinicius Alvim Passos Baldacim e Cynthia Pereira da Costa e Silva, mesmo já tendo saído da equipe antes da minha conclusão, não posso deixar de agradecê-los pelo companheirismo e amizade. A todos vocês meu muito obrigada por tudo! Sucesso!

À Stephanie Blima, Pamella Lorenci e a Milena Maia pela ajuda durante o experimento, grandes profissionais. Muito obrigada!

À Ana Carolina Paludo pela grande ajuda com a parte estatística da dissertação, essencial para a confecção deste trabalho. Muito obrigada, minha amiga! Sucesso!

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação pela amizade, companheirismo e ajuda! Sucesso à todos!!! Agradecimento especial para Aline, André, Bruna, Camila Freitas, Carolina Araújo, Carolina dos Anjos, Carolina Shecaira, Caroline Seino, Carolinne, Fábio, Fernanda, Francisco Leonardo, Frederico, Heloísa, Joyce, Júlia, Juliana, Jaqueline, Kamila, Matheus, Rejane, Renata, Renata Leite e Ronaldo.

Aos meus tios e primos que me acolheram em São Paulo, com muito carinho, em especial, agradeço ao meu Tio Cláudio e Tia Lygia, que me receberam em sua casa durante o início do mestrado e neste último ano. Meus primos, Felipe e Priscila obrigada pela amizade, foi um grande presente poder ter mais contato com vocês. E Patricia, minha prima-irmã, guerreira, te amo, obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos de sala, tanto do ensino fundamental quanto da graduação, que apesar da distância sempre me apoiaram e me ajudaram com muito carinho, muito obrigada! Gostaria de destacar alguns em especial: Ariani, muito obrigada pela indicação que fez de mim para sua irmã e principalmente pela sua amizade! À minha irmã do coração, Karina Pappotti meu muito obrigada pelas palavras de força e coragem, você é meu oposto mais perfeito! Ao Paulo Marcusso muito obrigada pela amizade verdadeira e incentivo para eu realizar o mestrado! Às minhas amigas de Capão Bonito, Amanda, Paula e Rafaela, a amizade de vocês é um carinho de Deus para mim! E aos amigos da equipe Vet Smart, muito obrigada!

À Cláudia Regina Stricagnolo pelo grande ajuda durante o experimento!!! Nosso ponto de equilíbrio no laboratório, muito obrigada de coração! À Samantha Ive Miyashiro por toda ajuda com os hemogramas e citômetro! E pela amizade! Muito obrigada! À Edna Santana por manter sempre os materiais em ordem e pela alegria musical nos laboratórios! À toda equipe dos Laboratórios da FMVZ/USP, Clara Mori, Maria Helena da Silva Pelissari e Marly Elizabethe Ferreira. E à Nicolle Gilda Teixeira de Queiroz Hazarbassanov do Laboratório do Departamento de Patologia pelos conhecimentos transmitidos e ajuda com o leitor de ELISA.

Às secretárias e funcionários do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

À pesquisadora Dra. Edviges Maristela Pituco e sua equipe do Laboratório de Viroses dos Bovinos do Instituto Biológico por ter doado o vírus (BoHV-1) para realização deste experimento.

A toda equipe da Fazenda Colorado, em especial aos veterinários Natália Meirelles Sobreira e ao Sergio Soriano, que juntamente com o Sr. Lair Antônio de Souza (In Memoriam) permitiram a execução do experimento com as bezerras da fazenda. E por todos os ensinamentos e ajuda durante o percurso. Na maternidade, gostaria de agradecer ao veterinário Alex Sica e aos funcionários Genivaldo, Luan, Luiz, Marcos, Róger e Valdecí pelos avisos, alertas de parto a qualquer hora. E no bezerreiro pelo carinho e cuidado incondicionais com as "meninas", obrigada Tonho, Adriano, Fernando, Thaina e Daia. E claro, um agradecimento especial a todas as bezerras que passaram pelo experimento, tanto no piloto, quanto no oficial, muito obrigada!

Ao Instituto de Zootecnia (APTA- Gado de Leite) onde pude ajudar nos primeiros experimentos da equipe e que com certeza aprendi muitas coisas que me auxiliaram para a confecção deste trabalho. Obrigada à Juliana Rodrigues Pozzi Arcaro, Cláudia Rodrigues Pozzi, Irineu Arcaro Junior, Mariana Miranda e aos funcionários Ana, Donizete, Creusa, Sr. Valter, Gilberto, Ivana, Luciandra, Izildinha, Tereza, Giovani e Felipe. E aos estagiários Gustavo, Rafaela, Ticianni e Guilherme.

Aos residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes- CBPR da época de 2012, 2013, 2014 e 2015. Em especial a Loraine, grande amiga que ganhei nessa caminhada, ao Ronaldo que esteve comigo durante todo o percurso na USP, desde o estágio curricular ao final do mestrado. E ao residentes Rodrigo, Marcela, Joel, Mailson e Giuliana que me ajudaram nas coletas do mestrado. Especial carinho à Camila, que além da ajuda no experimento se demonstrou uma grande colega de equipe. Muito obrigada e sucesso para vocês!

Aos vendedores de materiais laboratoriais: Walter- Sunmoon Produtos Científicos Ltda., Devanei e Thais- Interprise Instrumentos Analíticos Ltda., Adriana e Camila-

Sellex, Inc. e Marcelo, Patricia e Lilian- Sigma-Aldrich Brasil Ltda. que dispensaram sempre um atendimento especial com toda equipe.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP pela concessão do auxílio de pesquisa (2013/06152-7) e da bolsa de mestrado (2013/02484-5).

*“Amar o seu destino;
querer reconhecer suas tarefas,
assumi-las e realizá-las
de acordo com cada situação.
Amor para a ação,
servir ao próximo,
realizar as metas morais puramente intuitivas;
esforçar-se para elevar-se aos conteúdos
das idéias intuitivas cósmicas.
Apenas uma atuação querente
e que emana da intuição,
pode ser uma atuação individual.
Viver no amor pela ação
e deixar viver na compreensão do querer alheio;
É o princípio básico do homem livre.
Respeito e compreensão do destino do próximo. ”
Rudolf Steiner*

*"Comece fazendo o que é necessário
depois, o que é possível
e, de repente,
você estará fazendo o impossível."
São Francisco de Assis*

RESUMO

NOVO, S. M. F. **Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune de bezerros recém-nascidos.** [Effect of maternal colostrum leukocytes in immune response of newborn calves]. 2015. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Esta pesquisa avaliou o efeito da transferência passiva dos leucócitos do colostro na imunidade específica de bezerras recém-nascidas. Foram acompanhadas 20 bezerras Holandesas durante o período neonatal, distribuídas em dois grupos experimentais: grupo COL⁺ recebeu colostro fresco (4L) proveniente de suas respectivas mães; e grupo COL⁻ recebeu colostro congelado e acelular (4L), oriundo de vacas doadoras de colostro. As avaliações foram realizadas antes da mamada do colostro (M0), 1-2 (M1), 7 (M2), 14 (M3), 21 (M4) e 28 dias pós-nascimento (M5). As bezerras foram submetidas ao exame clínico, seguido da colheita das amostras sanguíneas para realização de hemograma, imunofenotipagem e cultivo celular. Os dois grupos foram colostrados com colostro de igual qualidade com relação à concentração de imunoglobulinas (70-120 g/L). A concentração de células do colostro fresco fornecido ao grupo COL⁺ foi de 1.895.849 células/mL. Não foi possível encontrar diferenças para as funções vitais em relação aos grupos experimentais. O exame específico dos sistemas revelou um caso de broncopneumonia, três de inflamação umbilical e maior frequência de escore de fezes 3 no COL⁻. As alterações clínicas foram refletidas no eritrograma das bezerras, sendo encontrado menor valor médio para a taxa de hemoglobina (HGB) no COL⁻ em M3. Em relação à idade, observou-se redução gradativa dos valores médios para He (hemácias), HGB, HCT (hematócrito) e índices hematimétricos no primeiro mês de vida. A frequência de bezerras anêmicas foi maior no grupo COL⁻ nos momentos M4 e M5. Em relação ao leucograma, observou-se diferença entre os grupos para linfócitos no M0 e M2 com valores superiores no COL⁻. Em relação aos momentos foi possível detectar leucocitose por neutrofilia no M0 e M1, observando-se inversão da relação neutrófilo:linfócito a partir desses momentos. Os valores de CD45⁺CD45RO⁻ foram maiores em M0 no COL⁻, além disso, observou-se aumento da expressão do marcador de memória celular CD45RO⁺ do M0 ao M1 nos dois grupos

experimentais. O $CD3^+ \text{gamma-delta}^-$ aumentou no decorrer do estudo, em contrapartida as células $CD3^+ \text{gamma-delta}^+$ foram menores em M5 com relação ao M0-M3. Foi detectado também aumento dos valores de $CD14^+ \text{MHCII}^+$ no primeiro mês de vida indicando maturação das células apresentadoras de antígeno. Em relação à produção de citocinas pelas células mononucleares sanguíneas, foi possível identificar maior concentração de IFN-gamma em M4, quando as células do COL⁻ foram estimuladas com *S. aureus* (1 mononuclear:10 bactérias inativadas). A concentração de IL-17 detectada a partir das células do COL⁺ foi maior em M3, quando as células foram estimuladas com ConA. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que: a) bezerras COL⁻ apresentaram maior frequência e intensidade de doenças que evoluíram para anemia da inflamação; b) bezerras COL⁻ apresentaram maior número absoluto de linfócitos, representadas especialmente pela subpopulação $CD3^+ \text{gamma-delta}^+$ nos episódios de maior frequência de diarreias; c) Linfócitos de memória $CD45RO^+$ aumentaram após a colostragem em ambos os grupos, sugerindo que outros componentes acelulares do colostro podem apresentar papel fundamental no desenvolvimento da resposta imunológica de bezerras recém-nascidas; d) a subpopulação $CD3^+ \text{gamma-delta}^-$ e as células $CD14^+ \text{MHCII}^-$ e $CD14^+ \text{MHCII}^+$ aumentaram durante o primeiro mês de vida, indicando maturação imunológica; e) as células mononucleares das bezerras não responderam ao Herpesvírus Bovino tipo 1, porém responderam aos estímulos bacterianos, especialmente para a *Escherichia coli*; a interpretação do leucograma em conjunto com a análise das variações apresentadas para as citocinas inflamatórias IFN-gamma e IL-17 permitem afirmar que as bezerras apresentaram resposta inflamatória retardada e de menor magnitude no COL⁻.

Palavras-chave: Bovinos. Células mononucleares. Imunidade passiva. Neonatos.

ABSTRACT

NOVO, S. M. F. **Effect of maternal colostrum leukocytes in immune response of newborn calves.** [Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune de bezerros recém-nascidos]. 2015. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

This study evaluated the effect of leukocytes passive transference from bovine colostrum in specific immunity of newborn calves. During neonatal period, 20 Holstein calves were followed. Animals were distributed in two experimental groups: COL⁺ which received fresh colostrum (4L) from their mothers, and COL⁻ which received frozen and acellular colostrum (4L) that came from donor cows. The evaluations were performed in the following moments: before colostrum intake (M0), 1-2 (M1), 7 (M2), 14 (M3), 21 (M4) and 28 days after birth (M5). Heifers were submitted to clinical examination. Then, blood samples were harvested for hemogram, immunophenotyping and cell culture. Both groups were fed with the same quality of colostrum (immunoglobulin concentration 70-120 g/L). The cell concentration of fresh colostrum that was provided to COL⁺ group was 1.895.849 cells/mL. It was not possible to detect differences in vital functions concerning the experimental groups. The system specific examination reveled one case of bronchopneumonia, three cases of umbilical inflammation and major rates of diarrhea score 3 in group COL⁻. Clinical alterations were reflected in calves erythrogram. It was found lower mean value for hemoglobin (HGB) in M3 for COL⁻. Regarding age, a gradual reduction in mean values for erythrocytes, HGB, HCT (hematocrit) and hematimetric rates were observed in the first month of life. The frequency of anemic heifers was higher in COL⁻ group at moments M4 and M5. Regarding leukogram, it was observed difference between groups for lymphocytes in M0 and M2 with higher values in COL⁻. Concerning moments, it was possible to detect leukocytosis by neutrophilia from M0 up to M1 and inversion of neutrophil:lymphocyte relation from this moment. Values of CD45⁺CD45RO⁻ was higher in M0 for COL⁻, furthermore, increase of cellular memory marker expression CD45RO⁺ was observed from M0 to M1 in both groups. The CD3⁺gamma-delta⁻ increased during the study. On the other hand, CD3⁺gamma-delta⁺ were lower in M5

in relation to M0-M3. Increase of CD14⁺MHCII⁺ values were also detected in the first month of life, indicating maturation of antigen presenting cells. Regarding cytokine production by mononuclear cells of heifers blood, it was possible to identify higher concentration of IFN-gamma in M4 when cells of COL⁻ were stimulated with *S. aureus* (1 mononuclear: 10 inactivated bacteria). The concentration of IL-17 detected from COL⁺ cells was higher in M3, when cells were stimulated with ConA. Based on these results, it can be concluded that: a) COL⁻ heifers presented higher frequency and intensity of diseases that evolved to anemia of inflammation; b) COL⁻ heifers presented higher lymphocyte absolute number, represented specially by CD3⁺gamma-delta⁺ subsets in episodes of higher frequency of diarrhea; c) memory lymphocytes CD45RO⁺ increased after colostrum intake in both groups, suggesting that other acellular colostrum components can present fundamental role in development of immunological response in newborn heifers; d) the subset of CD3⁺gamma-delta⁻ and the cells CD14⁺MHCII⁻ and CD14⁺MHCII⁺ increased during the first month of life, indicating immunological maturation; e) heifers mononuclear cells did not respond for herpes virus bovine type 1, however, responded for bacterial stimulus, specially *Escherichia coli*. The interpretation of leukogram with the variation of presented analyses for inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-17, allow to state that heifers presented delayed inflammatory response and of lesser magnitude in COL⁻.

Keywords: Bovines. Mononuclear Cells. Passive immunity. Neonates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ambiente no qual mães e bezerras foram mantidas durante o período experimental - São Paulo - 2014	41
Figura 2 - Esfregação da secreção mamária para controle da qualidade do colostro fresco - São Paulo - 2014.....	45
Figura 3 - Citômetro de Fluxo FACSCalibur - São Paulo - 2014.....	49
Figura 4 - Etapas inicialmente executadas para análise dos eventos no software Flowjo, obtidos nos ensaios de citometria de fluxo - São Paulo - 2014....	50
Figura 5 - Ensaio de avaliação leucócitos totais e de memória - São Paulo - 2014	50
Figura 6 - Ensaio de avaliação linfócitos T-gamma delta - São Paulo - 2014.....	51
Figura 7 – Ensaios de avaliação das células apresentadoras de antígenos (monócitos) - São Paulo - 2014.....	51
Figura 8 - Placa com meio ágar sangue de carneiro 5%, demonstrando a ausência de crescimento bacteriano após a inativação do <i>Staphylococcus aureus</i> - São Paulo - 2014.....	53
Figura 9 - Avaliação da viabilidade celular pela prova de exclusão de Azul de Tripán - São Paulo - 2014	55
Figura 10 - Preenchimento da placa de cultivo celular para a produção de IFN-gama e IL-4 pelas células mononucleares do sangue das bezerras - São Paulo - 2014.....	56
Figura 11 - Placas de cultivo celular mantidas em estufa de CO ₂ por três dias a 37°C - São Paulo - 2014.....	56
Figura 12 - Concentração de Igs no colostro, determinadas por meio de colostrômetro, fornecido às bezerras COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014 ...	59
Figura 13 - Valores médios para a frequência cardíaca (FC), das bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	60
Figura 14 - Valores médios para a frequência respiratória (FR) das bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	61
Figura 15 - Valores médios para a temperatura (TEMP) das bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	61
Figura 16 - Valores médios para hemácias (RBC), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	65

Figura 17 -	Valores médios para os teores de hemoglobina (HGB), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	65
Figura 18 -	Valores médios para hematócrito (HCT), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	66
Figura 19 -	Valores médios para o volume corpuscular médio (VCM), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014 .	67
Figura 20 -	Valores médios da hemoglobina corpuscular média (HCM), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	67
Figura 21 -	Valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	68
Figura 22 -	Valores de concentração de leucócitos totais (WBC), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	71
Figura 23 -	Valores de concentração de neutrófilos (NEUTR), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	71
Figura 24 -	Valores de concentração de linfócitos (LINF), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	72
Figura 25 -	Valores relativos de concentração de neutrófilos (NEUTR), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	72
Figura 26 -	Valores relativos de concentração de linfócitos (LINF), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	73
Figura 27 -	Valores absolutos das medianas de concentração de monócitos (10 ³ /μL), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	74
Figura 28 -	Valores relativos das medianas de concentração de monócitos (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	75
Figura 29 -	Valores relativos de CD3 ⁺ Gamma-delta ⁻ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	79
Figura 30 -	Valores relativos de CD3 ⁺ Gamma-delta ⁺ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	79

Figura 31 - Valores absolutos de CD3 ⁺ Gamma-delta ⁻ (10 ³ /μL), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	80
Figura 32 - Valores absolutos de CD3 ⁺ Gamma-delta ⁺ (10 ³ /μL), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e - São Paulo - 2014.....	80
Figura 33 - Valores relativos (%) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD45 e CD45RO no sangue de bezerras Holandesas COL ⁺ e COL ⁻ , no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014.....	82
Figura 34 - Valores absolutos (10 ³ /μL) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD45 e CD45RO no sangue de bezerras Holandesas COL ⁺ e COL ⁻ , no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014..	82
Figura 35 - Valores relativos de CD14 ⁺ MHCII ⁻ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	84
Figura 36- Valores relativos de CD14 ⁺ MHCII ⁺ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	84
Figura 37 - Valores absolutos de CD14 ⁺ MHCII ⁻ (10 ³ /μL), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	85
Figura 38 - Valores absolutos de CD14 ⁺ MHCII ⁺ (10 ³ /μL), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	85
Figura 39 - Valores médios encontrados nas concentrações de ConA (a), <i>S. aureus</i> 1:10 (b), <i>S. aureus</i> 1:50 (c) e <i>E. coli</i> (d), pelo teste imunoenzimático de IFN-gamma do cultivo celular de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	88
Figura 40 - Valores médios encontrados nas concentrações de ConA (a), <i>S. aureus</i> 1:50 (b) e <i>E. coli</i> (c), pelo teste imunoenzimático de IL-17 do cultivo celular de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão para frequências cardíaca, frequências respiratória e temperatura retal das bezerras recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014	60
Tabela 2 - Valores absolutos (relativos- %) para TPC, Turgor Cutâneo (T.C.), Linfonodos (L), mucosas (M), desidratação (D) e escore de fezes (E.F.) manifestados pelas bezerras dos grupos COL ⁺ e COL ⁻ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014	63
Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão para as variáveis hemácias (RBC), hematócrito (HCT) e hemoglobina (HGB) em bezerras Holandesas recém-nascidas do COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	64
Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão para os índices hematimétricos em bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014	66
Tabela 5 - Interpretação dos eritogramas de acordo com os valores estabelecidos para bezerras por BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND (2006) - São Paulo - 2014	69
Tabela 6 - Valores absolutos das variáveis relacionadas aos leucócitos totais (WBC), neutrófilos (NEUTR) e linfócitos (LINF) do leucograma em relação aos momentos estudados - São Paulo - 2014	73
Tabela 7 - Valores relativos das variáveis relacionadas aos leucócitos totais (WBC), neutrófilos (NEUTR) e linfócitos (LINF) do leucograma em relação aos momentos estudados - São Paulo - 2014	74
Tabela 8 - Valores relativos (%) e absolutos (10 ³ /μL) das medianas, e valores mínimo e máximo das variáveis monócitos, basófilos e eosinófilos - São Paulo - 2014	76
Tabela 9 - Valores relativos (%) e absolutos (10 ³ /μL) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD3 e Gamma-delta no sangue de bezerras Holandesas COL ⁺ e COL ⁻ , no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014	78
Tabela 10 - Valores relativos (%) e absolutos (10 ³ /μL) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD45 e CD45RO no sangue de	

bezerras Holandesas COL ⁺ e COL ⁻ , no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014.....	81
Tabela 11- Valores relativos (%) e absolutos (10 ³ /μL) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD14 e MHCII no sangue de bezerras Holandesas COL ⁺ e COL ⁻ , no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014.....	83
Tabela 12 - Valores médios das concentrações em pg/mL das citocinas IFN-gamma e IL17 do cultivo celular de bezerras Holandesas recém-nascidas COL ⁺ e COL ⁻ - São Paulo - 2014.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Escore para avaliação da viabilidade do bezerro recém-nascido pela escala de APGAR	41
Quadro 2 -	Parâmetros e intervalos de referência para as funções vitais, turgor cutâneo e tempo de preenchimento capilar (TPC) em bezerras no primeiro mês de vida	42
Quadro 3 -	Parâmetros, escores e quesitos adotados para a avaliação das mucosas, linfonodos, grau de desidratação (%) em bezerras no primeiro mês de vida	43
Quadro 4 -	Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida	44
Quadro 5 -	Escores de broncopneumonia adotado para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida	44
Quadro 6 -	Momentos das colheitas de sangue das bezerras recém-nascidas	46
Quadro 7 -	Especificações e concentrações de anticorpos monoclonais primários e secundários selecionados para a marcação dos leucócitos e subpopulações de linfócitos - São Paulo - 2014.....	48
Quadro 8 -	Ensaio de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue de bezerras da raça Holandesa - São Paulo - 2014	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BoHV-1	Herpesvírus Bovino Tipo-1
bpm	Batimentos por minuto
CCS	Contagem de Células Somáticas
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
ConA	<i>Concanavalin A</i>
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP	Efeito Citopático
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
FC	Frequência Cardíaca
FITC	<i>Fluorescent Isothiocyanate</i>
FR	Frequência Respiratória
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	gramas
GD	Gamma-delta
h	Horas
HCl	Cloreto de Hidrogênio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
He	Hemácias
HGB	Hemoglobulinas
IFN	<i>Interferon</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
Igs	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
L	Litros

LPS	Lipopolissacarídeo
M	Momento
MDBK	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MN	Mononucleares
mpm	Movimentos por minuto
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro
p.n.	pós nascimento
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PMN	Polimorfonucleares
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEB	<i>Staphylococcus enterotoxin B</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCID	<i>Tissue Culture Infective Doses</i>
TCR	<i>T cell Receptor</i>
Temp	Temperatura
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TPC	Tempo de preenchimento capilar
VCM	Volume corpuscular médio
WBC	<i>White Blood Cells</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
μ	Micro
$\text{\textcircled{R}}$	Marca Registrada
$>$	Maior que
$\leq$	Menor ou igual que
$<$	Menor que
$\%$	Porcentagem
G	Força G
$=$	Igual
$+$	Positivo
$-$	Negativo
$\pm$	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1 RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA- ASPECTOS GERAIS	30
2.2 INTERAÇÃO MATERNO-FETAL E IMPLICAÇÕES IMUNES AO NEONATO	34
2.3 TRANSFERÊNCIA PASSIVA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS	40
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
3.3 MANUTENÇÃO.....	45
3.4 COLHEITA DE AMOSTRAS	46
3.5 PROVAS IMUNOLÓGICAS.....	47
3.5.1 Determinação das subpopulações e ativação de leucócitos sanguíneos	47
3.5.2 Hemograma.....	51
3.5.3 Avaliação da resposta funcional dos leucócitos mononucleares do sangue para o <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> e BoHV-1	52
3.5.3.1 Preparo dos estímulos.....	52
3.5.3.2 Cultivo celular.....	53
3.6 ESTATÍSTICA	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 QUALIDADE DO COLOSTRO	58
4.2 EXAME CLÍNICO GERAL	59
4.3.1 Eritrograma.....	64
4.3.2 Leucograma	70
4.4 SUBPOPULAÇÕES E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES.....	77
4.4.1 Linfócitos T (CD3) gamma-delta (GD).....	77
4.4.2 Linfócitos de memória (CD45CD45RO)	81
4.4.3 Células Mononucleares (CD14MHCII).....	83
4.5 ATIVIDADE FUNCIONAL DAS CÉLULAS MONONUCLEARES SANGUÍNEAS PARA ANTÍGENOS BACTERIANOS E BoHV-1	86
5 DISCUSSÃO	90
5.1 QUALIDADE DO COLOSTRO	90

5.2 EXAME CLÍNICO GERAL	91
5.3 HEMOGRAMA	95
5.3.1 Eritrograma	95
5.3.2 Leucograma	96
5.4 SUBPOPULAÇÕES E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES.....	97
5.5 ATIVIDADE FUNCIONAL DAS CÉLULAS MONONUCLEARES SANGUÍNEAS PARA ANTÍGENOS BACTERIANOS E BoHV-1	102
6 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO

A transferência de imunidade celular da mãe ao neonato via secreção mamária foi sugerida no artigo de revisão escrito por Watson (1980).

O colostro bovino contém 1×10^6 células somáticas/mL, dentre as quais 32% são viáveis (GOMES et al., 2011; SILVA, 2014). Estas células são representadas por macrófagos-células epiteliais (69,5%), linfócitos (16,4%), neutrófilos (13,3%) e eosinófilos (0,27%) (GOMES et al., 2011).

A absorção das células maternas pelo epitélio intestinal dos neonatos foi comprovada inicialmente em suínos no trabalho de Williams (1993), em seguida, células maternas ativadas e marcadas foram detectadas na placa de Peyer e linfonodos de bovinos recém-nascidos (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998; LIEBER-TENÓRIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002). Além disto, células marcadas também foram detectadas na circulação sanguínea de bezerros neonatos 12 horas após a ingestão do colostro, atingindo um pico máximo às 24 horas e desaparecendo às 36 horas de vida (REBER et al., 2006).

Os leucócitos do colostro participam da resposta imune dos recém-nascidos. As respostas obtidas nos primeiros trabalhos foram limitadas quanto às técnicas imunológicas disponíveis na época, porém foram importantes para o levantamento de hipóteses à respeito da atividade funcional dos leucócitos do colostro (RIEDEL-CASPARI; SCHMIDT, 1991a,b; RIEDEL-CASPARI, 1993). Os trabalhos desenvolvidos na década passada comprovaram que não existe incompatibilidade entre o Complexo de Histocompatibilidade Principal- MHC da mãe e recém-nascido (REBER; HIPPEN; HURLEY, 2005), e que a ingestão de colostro com células aumentou precocemente a expressão de marcadores da maturação das subpopulações de células T (REBER et al., 2006; REBER et al., 2008a,b; LANGE et al., 2015), em contrapartida, o fornecimento do colostro fresco diminuiu a diferenciação das células B nos linfonodos (ALDRIDGE; MCGUIRK; LUNN, 1998). Apesar das pesquisas realizadas, a importância dos leucócitos maternos nos mecanismos da resposta imune específica aos patógenos foi apresentada apenas no trabalho de Donovan et al. (2007) para *Mycobacterium* spp e Vírus da Diarreia Viral Bovina.

A motivação para realização desta pesquisa foi o aprofundamento do tema a respeito da participação dos leucócitos do colostro nos mecanismos de imunidade específica de bezerras recém-nascidas para agentes virais (Herpesvírus Bovino Tipo-1- BoHV-1), bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) rotineiramente encontradas no sistema de produção.

A hipótese deste trabalho é de que os leucócitos do colostro fresco transferidos por imunidade passiva podem conferir maturidade imunológica às bezerras recém-nascidas mediante sua atuação em diferentes mecanismos da resposta imune. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência dos leucócitos do colostro bovino na imunidade específica de bezerras Holandesas recém-nascidas e susceptibilidade às doenças neonatais. Os objetivos específicos foram:

a) avaliar a susceptibilidade das bezerras às doenças neonatais de acordo com manejo de colostro fresco *versus* congelado;

b) avaliar o perfil hematológico das bezerras de acordo com o manejo do colostro fresco *versus* congelado;

c) estabelecer as proporções de linfócitos T CD3⁺, subpopulação de células T gamma-delta, monócitos CD14⁺ e células apresentadoras de antígeno (MHCII) no sangue de bezerras que receberam colostro com e sem células;

d) estabelecer as proporções e ativação dos linfócitos sanguíneos ativados pela marcação da células (CD45RO) antes e após a ingestão do colostro com e sem células;

e) avaliação da resposta imune específica para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e BoHV-1 de acordo com o manejo do colostro fresco *versus* congelado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA- ASPECTOS GERAIS

O sistema imune inato reconhece o patógeno por meio das células sentinelas, denominadas células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cell- APCs*), como macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Os antígenos apresentam grande heterogeneidade e variabilidade molecular, desta forma, o sistema imunológico reconhece primeiro estruturas moleculares altamente conservadas, que são compartilhadas por grandes grupos de microrganismos, chamados Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (*Pathogen Associated Molecular Pattern- PAMPs*) (TIZARD, 2008).

As paredes das bactérias Gram-positivas, como o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) são compostas por peptidoglicanos, lipoproteínas e ácido lipoteicoico. Bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli* (*E. coli*), são constituídas por peptidoglicanos, porinas, lipídio A e recobertas por uma camada de lipopolissacarídeo- LPS (TIZARD, 2008). O lipídio A é a principal porção da membrana das bactérias Gram-negativas responsável pela imunoestimulação da resposta inata do hospedeiro (DARVEAU, 1998).

PAMPs se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões localizados na membrana ou dentro do citoplasma das APCs que resulta na ativação das vias intracelulares de sinalização e secreção de moléculas. Por fim, a cascata de inflamação e resposta imune específica é desencadeada. Os PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) possuem afinidade com oligossacarídeos ricos em manose, peptídeoglicanos, lipopolissacarídeos da parede celular das bactérias, DNA bacteriano e viral que contém repetições não-metiladas de dinucleotídeos CpG e RNA viral de fita simples e dupla (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Alguns dos PRRs são chamados de receptores do tipo *Toll* (*Toll Like Receptors- TLRs*). O TLR-2 se liga aos componentes da parede das bactérias Gram-positivas; o TLR-4 associado ao CD14 se liga ao LPS das bactérias Gram-negativas; TLR-3, TLR-7 e TLR-8 reconhecem proteínas virais (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A sinalização para a ativação dos linfócitos virgens é desencadeada após a ligação entre PAMPs e os PRRs (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Linfócitos B e T apresentam diferentes receptores e funções adquiridas principalmente durante a maturação do sistema imune. Os linfócitos migram da medula óssea (B) ou timo (T) aos órgãos linfóides secundários para maturação após reconhecimento do patógeno associado a molécula de MHC presente na membrana das APCs. Células B serem ativadas diferenciam-se em células plasmáticas produtoras de imunoglobulinas- Igs (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As células T são originadas na medula óssea e diferenciam-se no timo. Neste órgão, as células são conhecidas como timócitos e expressam em sua superfície os receptores que contemplam *T Cell Receptors*- TCRs (CAMPANA et al., 1989) e um complexo pentamérico CD3, que associados formam um receptor funcional (DAVIS; BJORKMAN, 1988).

Existem duas linhagens de células T que se diferenciam pela estrutura do TCR, sendo a primeira delas constituída por uma cadeia glicoprotéica alpha e uma beta, formando o heterodímero alpha-beta; e a segunda linhagem composta pelo heterodímero gamma-delta. Ambas as subpopulações de linfócitos T possuem TCR com estrutura muito semelhante ao fragmento Fab das imunoglobulinas (DAVIS; BJORKMAN, 1988; GIRARDI, 2006). Linfócitos T alpha-beta predominantes em humanos, camundongos e provavelmente na maioria dos não ruminantes (60-99%). Em bezerros e cordeiros, ao contrário, até 40% dos linfócitos T podem apresentar receptores gamma-delta (WILSON et al.; 1996).

As subpopulações de células T possuem um precursor único (timócito), porém a intensidade da sinalização recebida pelo TCR determinará a diferenciação dessas células em linfócito T expressando heterodímeros gama-delta ou alfa-beta (HAKS et al., 2005; HAYES et al., 2005).

Inicialmente as células pré T passam por um processo chamado seleção positiva de acordo com a habilidade de reconhecer antígenos próprios ligados ao complexo MHC. Os timócitos cujo TCR não apresentam nenhuma afinidade pelo MHC próprio sofrem apoptose pela falta de estimulação, nesta fase a interação com moléculas de MHC de classe I ou II determinam a sua diferenciação do timócito em linfócito TCD8⁺ ou TCD4⁺, respectivamente (WILSON, 1991; GIRARDI, 2006; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Os coreceptores CD4 e CD8 são importantes para a função das células T. Os linfócitos T auxiliares apresentam CD4 em sua superfície e possuem função modulatória, e as células TCD8 são citotóxicas (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Uma grande proporção das células T gamma-delta dos bovinos expressam um receptor de superfície chamado WC1 (O'KEEFE et al., 1999). Wang e colaboradores (2009) sugeriram que o WC1 possa exercer um papel semelhante aos desencadeados pelos coreceptores CD4 ou CD8.

As respostas específicas do sistema imune envolvem um complexo mecanismo a partir das subpopulações de linfócitos auxiliares: linfócito T auxiliar 0 (Th0), 1 (Th1), 2 (Th2) e 17 (Th17), que podem ser distinguidas por meio das citocinas secretadas (TIZARD, 2008).

As células T CD4⁺ *nãive* se diferenciam em células T efectoras Th1 ou Th2 após estímulo antigênico pelas APCs (LEE et al., 2006). A ligação entre a molécula CD80, expressa na superfície dos macrófagos e células B, com células Th0 resultam na produção da citocina interleucina (IL)-12 pelas APCs e diferenciação das células de Th0 para Th1. A diferenciação em Th2 ocorre pela ligação do receptor CD86 expresso nas APCs e linfócitos B ativados, na presença de IL-1 (TIZARD, 2008).

Células Th1 produzem IL-2 e IFN-gamma responsáveis pela diferenciação dos linfócitos em células TCD8. A atividade citotóxica pelos linfócitos TCD8⁺ contra patógenos intracelulares produz IFN-gamma e TNF-beta para ativar o recrutamento de células inflamatórias (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996).

Células Th2 produzem principalmente citocinas IL-4, IL-5 e IL-6. A IL-4 induz a ativação e diferenciação dos linfócito B em plasmócitos produtores de Igs, principalmente IgG1 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As células Th1 medeiam a imunidade celular direcionada às bactérias e vírus intracelulares, enquanto a resposta Th2 está vinculada ao desencadeamento da imunidade humoral contra microrganismos extracelulares (LEE et al., 2006).

A resposta imune antígeno-específica resulta em memória celular, que pode ser avaliada pela expressão de alguns marcadores. Leucócitos expressam um antígeno leucocitário comum chamado CD45 em sua superfície, formado por uma proteína transmembrana tirosina fosfatase (LEWIS et al., 1991; PELAN-MATTOCKS; PESCH; KEHRLI, 2001). Moléculas da família CD45 são coreceptores relacionados a transdução de sinal emitido pelo receptor de células T (CD3⁺), após o

reconhecimento antígeno específico, que resulta em expansão clonal (BEMBRIDGE et al., 1995).

A família do anticorpo monoclonal CD45 possui diferentes isoformas, divididas em subgrupos com base no seu peso molecular: 180.000 (CD45RO⁺) e 205.000 à 220.000 (CD45⁺). O CD45RO⁺ tem sido associado à memória celular (AKBAR et al., 1988), observando-se baixa expressão desse marcador nas células T *nãive* (BEMBRIDGE et al., 1995).

A diferenciação das células Th0 em Th17 ocorre pela sua estimulação mediante a liberação do fator de transformação do crescimento beta (*Transforming Growth Factor- TGFβ*) e IL-6 ou IL-21, respectivamente produzidos por plaquetas, macrófagos ativados, neutrófilos e células B e T; células endoteliais, macrófagos e células T; e células Th2 ativadas (MANGAN et al., 2006).

As células Th17 diferenciadas produzem seis membros da família de IL-17: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), e IL-17F (KOLLS; LINDÉN, 2004).

Embora a maioria das pesquisas sobre a produção de IL-17 tenha sido realizado em células T CD4⁺ *nãive* alpha-beta, foi relatado que as células gamma-delta representam a principal fonte dessa citocina. As citocinas produzidas pelas células Th17 recrutam os neutrófilos para os tecidos periféricos inflamados (ROARK et al., 2008).

Estudos demonstraram que a resposta Th17 é importante para a imunidade antibacteriana (YE et al., 2001; OKAMOTO YOSHIDA et al., 2010). A predominância das células T gamma-delta no epitélio e nos tecidos linfóides associados as mucosas sugere que essas células representam papel fundamental na etiopatogenia das diarreias bacterianas (MÖLNE et al., 2003).

Shibata et al. (2007) observaram que a depleção das células T gamma-delta em ratos infectados por *E. coli* resultou na diminuição da concentração de IL-17 e infiltração de neutrófilos na cavidade peritoneal.

Lin et al. (2009) estudaram a infecção por *S. aureus* e demonstraram que as respostas Th1 e Th17 foram importantes para a ativação dos fagócitos e recrutamento dessas células para os locais de infecção.

2.2 INTERAÇÃO MATERNO-FETAL E IMPLICAÇÕES IMUNES AO NEONATO

Fenômenos ocorridos durante a gestação influenciarão no *status* imunológico dos recém-nascidos ao nascimento (WEGMANN et al., 1993). A interação entre o sistema imune materno e o ambiente feto-placentário durante a gestação, resulta na produção das citocinas vinculadas à resposta imunológica do tipo Th1, como TNF-beta e IFN-gamma. Estas citocinas exercem efeitos deletérios ao ambiente feto-placentário induzindo a inflamação e necrose das células do trofoblastos. Em contrapartida, citocinas do tipo Th2 são benéficas à gestação, pois promovem a proliferação e diferenciação das células do trofoblastos e placentação. Além disso, a resposta Th2 suprime a resposta Th1 (WEGMANN et al., 1993).

A manutenção da gestação será favorecida pela modulação da resposta imune materna e fetal para o tipo Th2. Assim, neonatos apresentarão predomínio da resposta imune humoral e supressão da resposta imune celular do tipo Th1 ao nascimento, fato que pode torná-los susceptíveis aos agentes virais e outros patógenos intracelulares (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

O crescimento fetal ocorrido em ambiente uterino estéril apresenta como vantagem a garantia da sobrevivência do produto. Em contrapartida, neonatos apresentarão sistema imune específico *náïve* devido à ausência de exposição antigênica durante a prenhez (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). A imaturidade imunológica das bezerras recém-nascidas determina baixa produção de níveis de IgGs para protegê-las dos desafios ambientais (MCGUIRK; COLLINS, 2004; CORTESE, 2008).

Em ruminantes, a placenta do tipo sineptélicorior impede a passagem de anticorpos durante a gestação, assim os recém-nascidos apresentarão agamaglobulinemia ao nascimento (BARRINGTON; PARRISH, 2001).

O aumento dos níveis de cortisol materno e fetal no final da gestação e trabalho de parto (BARRINGTON; PARRISH, 2001), promovem linfopenia e neutrofilia, compatíveis com o leucograma de estresse (LA MOTTE; EBERHART, 1976). Além disto, esta substância diminui a atividade fagocítica, tais como dos macrófagos e neutrófilos (BARRINGTON; PARRISH, 2001).

Para sanar as deficiências apresentadas ao nascimento deve-se realizar assistência imunológica pela administração do colostro. O colostro é composto por

fatores nutricionais e elementos imunoprotetores solúveis e celulares. Os principais componentes imunológicos do colostro bovino são: imunoglobulinas, leucócitos e citocinas (CROSS; GILL, 2000; KORHONEN; MARNILA; GILL, 2000). Além disso, este alimento contém fatores que estimulam o crescimento dos recém-nascidos como o fator de crescimento semelhante a insulina (*Insulin-like growth factor I*- IGF-I) e componentes antimicrobianos como lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase (PAKKANEN; AALTO, 1997).

A concentração de Igs das classes G, A e M presentes no colostro de vacas da raça Holandesa de primeira ordenha é de 10.078; 413,8 e 625 mg/dL, respectivamente (GOMES, 2008). Estas Igs são transferidas da circulação sanguínea da mãe à secreção mamária durante o período de colostrogênese (BARRINGTON; PARRISH, 2001).

A IgG1 representa aproximadamente 90% das IgGs do colostro (ELFSTRAND et al., 2002), e protegem o neonato por mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (BIBURGER; LUX; NIMMERJAHN, 2014). O colostro deve apresentar concentrações de Igs acima de 50 g/L (GODDEN, 2008).

Durante as primeiras horas de vida, o abomaso das bezerras apresentam pequena produção de HCl, atividade mínima da pepsina gástrica, presença de fator inibidor de tripsina e baixa atividade proteolítica intestinal. Estes fatores protegem as Igs do colostro do processo de digestão gastrintestinal (KRUSE, 1983). No intestino, as Igs se ligam aos receptores Fc dos enterócitos (FcRn) responsáveis pelo transporte ativo do lúmen intestinal para a circulação sanguínea dos neonatos (TIZARD, 2008). A permeabilidade do epitélio intestinal à macromoléculas ocorre apenas entre as primeira 18-24 horas de vida dos neonatos bovinos (GODDEN, 2008), devido a substituição das células intestinais que expressam os receptores FcRn (TIZARD, 2008). Desta forma, sugere-se que seja fornecido o volume mínimo de quatro litros de colostro nas primeiras seis horas de vida até o período máximo de 12 horas (MCGUIRK; COLLINS, 2004).

2.3 TRANSFERÊNCIA PASSIVA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO

A transferência de imunidade celular da mãe ao neonato via secreção mamária foi sugerida no artigo de revisão escrito por Watson (1980).

O colostro bovino contém 1×10^6 células somáticas/mL, dentre as quais 32% são viáveis (GOMES, 2011; SILVA, 2014), sendo que as células predominantes no colostro são os leucócitos (BOUTINAUD; JAMMES, 2002).

No colostro bovino, 69,5% das células presentes correspondem aos monócitos e células epiteliais, 16,4% de linfócitos, 13,3% aos neutrófilos e 0,27% aos eosinófilos (GOMES et al., 2011). A subpopulação linfocitária é composta por 66,9% de linfócitos T ($CD3^+$) e 24% de linfócitos B ($CD21^+$). Dentre a população de LT, 24,6% são auxiliares ($CD4^+$) e 26,0% citotóxicos ($CD8^+$) (BARRINGTON; PARISH, 2001; OHTSUKA et al., 2010). Kiku et al. (2010) relataram 13,63 a 1,88% de células $TWC1^+$ no colostro.

A atividade funcional dos leucócitos do colostro é pouco estudada, devido a presença abundante de debris celulares, gordura, proteínas e partículas auto-fluorescentes que dificultam a separação das células do colostro para avaliação funcional (GOMES et al., 2014; MEGANCK et al., 2014). Apesar deste entrave, pesquisas têm demonstrado que o oferecimento de colostro fresco contendo células podem ser responsável pela estimulação precoce do sistema imune das bezerras em relação àquelas que receberam colostro congelado sem células. O congelamento do colostro promove a lise dos leucócitos e reduz a sua viabilidade de 17,22 a 29,71% para 0%, respectivamente, antes e após duas semanas de congelamento (NOVO et al., 2014).

A capacidade de migração dos leucócitos maternos por entre os enterócitos foi comprovada inicialmente em suínos (WILLIAMS, 1993). Em seguida, Liebler-Tenório; Riedel-Caspari e Pohlenz (2002) comprovaram a suspeita da absorção dos leucócitos maternos pelo epitélio intestinal de bezerras. Células maternas marcadas com o fluorocromo FITC (*Fluorescent Isothiocyanate*) foram injetadas no jejuno médio e íleo de três bezerros machos, cerca de 5 horas (h) após o nascimento, em seguida, os animais foram eutanasiados entre 1,5-2,0 horas após o procedimento, para obtenção de material intestinal e detecção das células marcadas pela prova de imunoperoxidase. Estes autores observaram células marcadas nas placas de Peyer

do jejuno e íleo, demonstrando a capacidade de migração dos leucócitos colostrais pela mucosa intestinal de bezerros recém-nascidos.

A transferência dos leucócitos do colostro também foi avaliada por Reber et al. (2006). Células mononucleares provenientes do sangue periférico de vacas gestantes foram marcadas com substância fluorescente (PKH26-GL) e adicionadas à um *pool* de colostro acelular (AC), em seguida, o alimento foi administrado à bezerros recém-nascidos. Os leucócitos maternos foram encontrados na circulação sanguínea dos bezerros recém-nascidos, com pico máximo de 24h e desapareceram em 36h após a ingestão do colostro. Os pesquisadores sugeriram que as células maternas migraram pelo sangue para os tecidos linfóides periféricos.

Riedel-Caspari e Schmidt (1991a) analisaram 45 bezerros, distribuídos em 4 grupos experimentais: bezerros que receberam colostro com células (COL⁺); sem leucócitos (COL⁻), sucedâneo lácteo suplementado com células do colostro (MS⁺) e sucedâneo lácteo sem células (MS⁻). Foi observado maior número de linfócitos sanguíneos, maior resposta blastogênica quando essas células foram estimuladas com *Concanavalina A* (ConA) e maior concentração de anticorpos séricos no grupo COL⁺, quando comparados ao COL⁻. O grupo MS⁺ demonstrou maior resposta proliferativa dos linfócitos que o MS⁻, porém, todos os animais do MS⁻ e MS⁺ desenvolveram diarreia no 3º dia de vida e apresentaram taxas de mortalidade equivalentes a 71,42% (MS⁺) e 50% (MS⁻).

Riedel-Caspari e Schmidt (1991b) também observaram maior produção de anticorpos específicos para *E. coli* no COL⁺ em relação ao COL⁻, do 2º ao 28º dia de vida. Os grupos tratados com sucedâneo apresentaram baixas concentrações de anticorpos específicos para *E. coli*. O grupo MS⁻ apresentou síntese precoce de IgA e maiores concentrações de IgG e IgM ao longo do estudo, em relação ao MS⁺, fenômeno oriundo de estimulação natural aos patógenos ambientais e desenvolvimento de imunidade ativa. Assim, estes autores concluíram que a presença das células no grupo MS⁺ causou prejuízos para o desenvolvimento da imunidade ativa.

Riedel-Caspari (1993) infectou 20 bezerros às 3 horas de nascimento pela inoculação oral de 10⁹ colônias de *E. coli* enteropatogênica. Imediatamente após o fornecimento das bactérias os bezerros receberam *pool* de colostro com células (COL⁺) e sem células (COL⁻). O grupo COL⁺ excretou menor quantidade de bactérias nas fezes e apresentaram maior concentração de Acs IgA e IgM específicos para *E.*

coli, sugerindo que os leucócitos do colostro contribuem para imunidade passiva e resistência dos bezerros jovens.

Aldridge, McGuirk e Lunn (1998) avaliaram o efeito da ingestão do colostro na subpopulação de linfócitos B presente nos linfonodos de bezerros recém-nascidos. Os bezerros foram separados em 4 grupos: colostro fresco, sucedâneo lácteo, colostro acelular e grupo de bezerras que não receberam qualquer tipo de tratamento. Os animais foram eutanasiados 36 a 48 horas após o fornecimento do colostro e seus linfonodos foram analisados por meio de imunoistoquímica utilizando-se os anticorpos monoclonais IgA, IgG1, IgG2 e IgM. Os 4 grupos apresentaram IgM e IgA na superfície dos linfócitos B, além disso, os bezerros que receberam sucedâneo e os não tratados também foram positivos apenas para IgG1 e IgG2. Estes dados sugeriram que a ingestão do colostro celular ou acelular suprimiu a diferenciação das células B.

Reber, Hippen e Hurley (2005) avaliaram o efeito das células do colostro na resposta imune de bezerros recém-nascidos pela avaliação da resposta proliferativa dos leucócitos mononucleares do sangue estimulados com toxina *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB). Os autores compararam a resposta proliferativa dos bezerros que receberam colostro fresco (n=5) e acelular (n=5) das suas respectivas mães. O grupo de bezerras que mamou o colostro fresco apresentou um aumento da resposta proliferativa dos linfócitos estimulados por SEB nas primeiras 3 semanas de vida, alcançando valores similares aos dos adultos. Em contrapartida, o outro grupo que recebeu colostro acelular apresentou baixas resposta para efeito das nas duas primeiras semanas pós-nascimento.

Reber et al. (2008b) detectaram maior expressão de CD11a, CD11c e CD14 nas células da linhagem monócitos em bezerros que receberam colostro acelular (AC), em comparação com aqueles que receberam colostro fresco contendo leucócitos (C), entretanto, as células desse grupo expressavam menor proporção de CD25 e MHCI. A maioria das diferenças significativas foram detectadas nos primeiros sete dias de vida. Estes dados sugeriram que os bezerros AC apresentaram maior proporção de marcadores indicativos de processos inflamatórios, e que o grupo C apresentou maior ativação celular (CD25⁺) e potencial para apresentação de antígenos.

Reber et al. (2008a) também encontraram maior porcentagem de linfócitos (CD3⁺) ativados, pela identificação dos marcadores CD25 e CD26, aos sete dias

pós-nascimento no COL⁺. A densidade de linfócitos expressando o MHC de classe I foi maior no grupo de bezerros que receberam células do colostro. Em geral, estes resultados indicaram que a transferência de células maternas permitiu o desenvolvimento e ativação dos linfócitos presente na circulação sanguínea de bezerros recém-nascidos.

Donovan et al. (2007) avaliaram os efeitos dos leucócitos colostrais na imunidade do sangue de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e *Mycobacterium* spp até 28 dias de vida pós-nascimento. As mães dos recém-nascidos foram vacinadas apenas para o BVDV. Os referidos autores observaram que a ingestão de colostro com células viáveis favoreceu a resposta proliferativa das células mononucleares do sangue ao vírus. O mesmo fenômeno não foi observado para o *Mycobacterium* spp, portanto, acredita-se que a transferência da resposta imune celular ao bezerro recém-nascido depende do contato prévio da mãe com o antígeno e produção de células efetoras de memória.

Bandrick et al. (2014) avaliaram a transferência e a função da imunidade materna em leitões por meio de imunofenotipagem, ensaio imunoenzimático e proliferação celular. O perfil das subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e gamma-delta no sangue e colostro das porcas e seus respectivos neonatos foi diferente. Em contrapartida, o perfil encontrado para Igs no soro das mães e filhotes foi semelhante. Além disto, estes autores verificaram maior resposta proliferativa para o *Mycoplasma hyopneumoniae* no grupo de leitões que receberam colostro com células.

Langel et al. (2015) avaliaram 37 bezerras das raças leiteiras Holandesas e Jersey que receberam colostro materno fresco (COL⁺) e sem células (COL⁻). Os animais foram avaliados por meio da imunofenotipagem sanguínea, escore de fezes e presença de doenças respiratórias. Bezerras COL⁻ apresentaram maior ocorrência de doenças respiratórias, porém não foi possível comprovar diferença para o escore de fezes entre os grupos experimentais. O grupo COL⁻ quando comparado com ao COL⁺ apresentou valores menores de CD4⁺, TCD4⁺CD62L⁺CD45RO⁻ e TCD4⁺CD62L⁺CD45RO⁺, no primeiro mês de vida. Em contrapartida, as bezerras COL⁻ apresentaram maior expressão de TCD4⁺CD62L⁻CD45RO⁺ e monócitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS

Foram selecionadas 20 bezerras, da raça Holandesa de pelagem preta e branca, provenientes de fazenda localizada na cidade de Araras, interior do estado de São Paulo. Os partos foram assistidos para separação das recém-nascidas imediatamente após o nascimento (Figura 1).

Para inclusão das bezerras nesta pesquisa, foi adotada a avaliação da viabilidade destas pela escala de APGAR (Quadro 1). Somente foram incluídas bezerras oriundas de partos eutócicos que apresentaram APGAR 7 e 8, segundo os critérios estabelecidos por Born (1981).

Figura 1 - Ambiente no qual mães e bezerras foram mantidas durante o período experimental - São Paulo - 2014

(c)

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: (a) Maternidade; (b) momento do parto; (c) bezerra recém-nascida oriunda de parto eutócico separada da mãe após o nascimento.

Quadro 1 - Escore para avaliação da viabilidade do bezerro recém-nascido pela escala de APGAR

Critérios de avaliação	Escore		
	0	1	2
Resposta à água fria, força muscular (levantamento de cabeça, tentativa de ficar em estação)	Ausente	Reduzido	Ativo, movimentos espontâneos
Reflexo interdigital e ocular	Ausente	Reação fraca/ Pelo menos um reflexo presente	Reação imediata/pelo menos dois reflexos presentes
Coloração de mucosa	Branca-Congesta	Azul	Rósea-Vermelha
Atividade respiratória	Ausente	Arritmia	Intensidade padrão e frequência normais

Fonte: (BORN, 1981).

Legenda: 7-8 sadios; 4-6 deprimidos; 0-3 inviáveis.

A cura do umbigo foi realizada logo após o nascimento, pela imersão completa do cordão umbilical em recipiente contendo tintura de iodo a 10% por pelo menos 1 minuto e meio, repetindo-se o processo após 12 horas. A partir do segundo dia, foi utilizada tintura de iodo a 5% duas vezes ao dia até mumificação do cordão umbilical.

As bezerras também foram avaliadas por meio do exame do estado geral, funções vitais (frequência cardíaca- FC, respiratória- FR, temperatura corpórea- Temp, grau de hidratação), mucosas oculares, características das fezes, escore de broncopneumonia e acompanhamento de cicatrização umbilical, excluindo-se os animais que apresentaram qualquer alteração orgânica. Os critérios adotados para a interpretação dos achados oriundos do exame clínico estão especificados nos quadros 2 a 5.

Quadro 2 - Parâmetros e intervalos de referência para as funções vitais, turgor cutâneo e tempo de preenchimento capilar (TPC) em bezerras no primeiro mês de vida

Exame clínico	Parâmetros	Intervalos de Referência				
		1 hora após nascimento	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
Funções Vitais	FC (bpm)	100,0-150,0	124,0±2,0	105,0±3,0	101,0±3,0	86,0±2,0
	FR (mpm)	50,0-75,0	59,0±8,8	46,0±7,0	40,0±8,4	33,0±9,0
	TEMP (°C)	39,0-39,5	38,6±0,3	39,0±1,0	39,0±0,4	39,0±0,3,0
	Turgor	<2 segundos				
	TPC	1-2 segundos				

Fonte: (DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 2008; MCGUIRK, 2008, adaptação de NOVO, S. M. F., 2014).

Quadro 3 - Parâmetros, escores e quesitos adotados para a avaliação das mucosas, linfonodos, grau de desidratação (%) em bezerras no primeiro mês de vida

Parâmetros	Escore	Quesitos
Coloração das Mucosas oculares	0	Branca
	1	Rósea clara
	2	Rósea
	3	Avermelhada
Volume dos Linfonodos	0	Normal
	1	Aumentado
	2	sensível e nodulado
Desidratação (%)	Até 5% (não aparente)	Diminuição da elasticidade da pele discreta ou sem alteração. Enoftalmia ausente ou muito discreta. Estado geral sem alteração ou levemente alterado. Apetite preservado/sucção geralmente presente. Animal alerta e em posição quadrupedal.
	6 - 8% (leve)	Diminuição da elasticidade da pele (de 2 a 4 segundos). Enoftalmia leve. Animal ainda alerta.
	8 - 10% (moderada)	Diminuição da elasticidade da pele (6 a 10 segundos). Enoftalmia evidente. Diminuição dos reflexos palpebrais. Diminuição da temperatura das extremidades dos membros, de orelhas e focinho. Mucosas secas. Mantém-se em posição quadrupedal e/ou em decúbito esternal. Apatia de intensidade variável.
	10 - 12% (grave)	Diminuição marcante da elasticidade de pele (> 10 segundos). Enoftalmia intensa. Extremidades, orelhas e focinho frios. Tônus muscular diminuído ou ausente. Mucosas ressecadas. Reflexos muito diminuídos ou ausentes. Decúbito lateral. Apatia intensa.
	>12% (Gravíssimo)	Possível óbito.

Fonte: (BENESI; KOGIKA, 2011; DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 2008, adaptação de NOVO, S. M. F., 2014).

Quadro 4 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida

Parâmetros	Escores
Consistência normal: firme, coloração amarronzada, períneo e cauda limpos e secos	0
Pastosas, semi-formada	1
Pastosa com maior quantidade de água: permanece sobre a “cama”; conteúdo fecal aderido no períneo e cauda	2
Líquida: aquosa, conteúdo fecal aderido no períneo e cauda	3

Fonte: (MCGUIRK, 2008).

Quadro 5 - Escores de broncopneumonia adotado para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida

Escores	Temperatura retal	Tosse	Secreção nasal	Secreção ocular	Posicionamento das orelhas
0	37,7 - 38,2	Ausente	Serosa	Serosa	Normal
1	38,3 - 38,8	Presente e única, quando estimulada	Pouca quantidade, unilateral	Pouca quantidade	Balançar das orelhas ou cabeça
2	38,9 - 39,3	Presente e repetidas, quando estimulada, ou ocasionais, quando espontâneas	Excessiva, mucosa e bilateral	Moderada quantidade bilateral	Ligeiramente pendente, unilateral
3	≥ 39,4	Presente, repetidas e espontâneas	Abundante, mucopurulenta, bilateral	Intensa quantidade, bilateral	Pendentes intensamente, bilateral ou torção da cabeça

Fonte: (POULSEN; MCGUIRK, 2009).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As bezerras recém-nascidas (n=20) foram distribuídas em dois grupos experimentais: COL⁺ e COL⁻. Bezerras COL⁺ (n=10) receberam colostro fresco com células, oriundo das suas respectivas mães, ordenhadas imediatamente após a parição. O colostro dos dois grupos foi avaliado por meio de colostrômetro.

Bezerras COL⁻ (n=10) receberam colostro de 1ª ordenha sem células, previamente congelado à -20°C pelo período mínimo de duas semanas. O colostro

congelado foi obtido a partir do volume excedente de vacas doadoras após a amamentação das suas respectivas filhas.

Foram colhidas amostras do *pool* de colostro administrado aos dois grupos experimentais para análise da sua qualidade imunológica.

Todas as bezerras receberam o mínimo de quatro litros de colostro, divididos em duas mamadas, sendo a primeira realizada até as primeiras seis horas de vida e a segunda até no máximo 12 horas após o nascimento.

Para a confirmação da presença de leucócitos no colostro do grupo COL⁺ foram realizados esfregaços da secreção mamária (Figura 2), diluída na proporção de 1:1 em PBS (*Phosphate-Buffered Saline* - Anexo A). A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada em microscópio óptico no aumento de 1000x, segundo os procedimentos descritos por Gomes (2008); e a avaliação indireta da concentração de IgG (imunoglobulinas) foi verificada pelo colostrômetro.

Figura 2 - Esfregaço da secreção mamária para controle da qualidade do colostro fresco - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: (a) célula mononuclear; (b) glóbulos de gordura

3.3 MANUTENÇÃO

Após o nascimento, as bezerras foram mantidas em abrigos individuais forrados com feno, onde receberam os primeiros cuidados, como colostragem e a cura do umbigo. O fornecimento do colostro (até 12 horas de vida) e as primeiras

mamadas de leite foram realizadas em mamadeiras.

Aos sete dias de vida, as bezerras foram transferidas para gaiolas de metal individuais e suspensas, onde foram mantidas até o final do experimento (28 dias).

A partir deste momento os animais foram alimentados em baldes, duas vezes ao dia, sendo fornecido um total de seis litros de leite, além do fornecimento de ração comercial¹ e água *ad libitum*.

3.4 COLHEITA DE AMOSTRAS

Foram obtidas amostras de sangue das bezerras, por meio de punção da veia jugular, utilizando sistema a vácuo, em tubos siliconizados contendo EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*- Anexo B) e seringas com capacidade para 60mL, contendo 1,5mL de EDTA a 100mM, com o auxílio de agulha para múltiplas colheitas (25x8 mm) para posterior determinação das provas imunológicas.

As bezerras foram acompanhadas do nascimento até os 28 dias de vida. Os momentos das colheitas das amostras estão descritos no quadro 6.

Quadro 6 - Momentos das colheitas de sangue das bezerras recém-nascidas

Momentos (M)	Idade (dias)	Análises
M0	Imediatamente após o nascimento (p.n.)	*Imunofenotipagem, hemograma, exame clínico
M1	24-48 horas de vida	*Imunofenotipagem, hemograma, exame clínico
M2	7° dia p.n.	Cultivo celular, Imunofenotipagem, hemograma, exame clínico
M3	14° dia p.n.	Cultivo celular, Imunofenotipagem, hemograma, exame clínico
M4	21° dia p.n.	Cultivo celular, Imunofenotipagem, hemograma, exame clínico
M5	28° dia p.n.	Cultivo celular, Imunofenotipagem, hemograma, exame clínico

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

¹ Rumileite 20®, Guabi

3.5 PROVAS IMUNOLÓGICAS

A resposta imune específica foi avaliada pela quantificação das subpopulações de leucócitos sanguíneos, sua ativação e funcionalidade em resposta ao *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e Herpesvírus Bovino Tipo 1.

3.5.1 Determinação das subpopulações e ativação de leucócitos sanguíneos

As subpopulações e ativação dos leucócitos sanguíneos foram avaliadas utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para receptores de superfície celular, associados com marcadores de diferenciação e ativação, pela técnica de citometria de fluxo, conforme painel de ensaios de anticorpos selecionados (Quadro 7).

Para tanto, foram transferidos 100µL do sangue total obtido em tubos com EDTA, para tubos de citometria de fluxo. A lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 900µL de solução comercial (*Facslysing*²), e os tubos mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 4°C, 274G por 8 minutos; o sobrenadante foi desprezado e os leucócitos foram ressuspensos em 1mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), a mistura foi novamente centrifugada a 274G, durante 8 minutos, a 4°C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos reservado.

Para marcação das células foram adicionados 100µL da solução contendo os anticorpos monoclonais primários, nas concentrações especificadas no quadro 7. Em seguida, as amostras foram mantidas sobre gelo por 40 minutos e novamente lavadas em solução de PBS. Posteriormente, foram adicionados anticorpos monoclonais secundários, para emissão das fluorescências identificadas pelo citômetro de fluxo³ (Figura 3), utilizando-se os fluorocromos⁴ FITC (*Fluorescent Isothiocyanate*) e PE (*Phycoerythrin*), permanecendo por 30 minutos, sobre o gelo,

² BD número catálogo 349202

³ FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA)

⁴ Invitrogen® e Becton Dickinson Immunocytometry System®

em ambiente escuro.

As amostras foram então submetidas à três lavagens com PBS e ressuspendidas com 300µL e reservadas para avaliação das fluorescências emitidas nos comprimentos de onda 488-525nm (FITC) e 480nm (PE) em citômetro de fluxo. Os ensaios realizados foram descritos no quadro 8.

Quadro 7 - Especificações e concentrações de anticorpos monoclonais primários e secundários selecionados para a marcação dos leucócitos e subpopulações de linfócitos - São Paulo - 2014

Anticorpos Monoclonais Primários	Isotipo	Especificidade	Clone	AC 1°	Fonte	Ac Secundário	Ac 1ª:2ª
Mouse anti-bovine CD45 ²	IgG2a	Leucócitos totais	CACTB51 A	1:50	BOV2039	FITC-332201	1:100
Mouse anti-bovine MHCII ²	IgG2a	Células apresentadoras de antígenos	TH16A	1:50	BOV2115	FITC-332201	1:25
Mouse anti-bovine CD45RO ²	IgG1	Ativação de leucócitos	GC42A	1:100	BOV2043	PE-P21129	1:100
Mouse anti-bovine CD3 ²	IgG1	Linfócitos T	MM1A	1:25	0561B-100	PE-P21129	1:100
Mouse anti-bovine CD14 ²	IgG1	Monócitos	MM61A	1:100	BOV2109	PE-P21129	1:100
Mouse anti-bovine GAMMA DELTA ²	IgG2b	Linfócito T gamma-delta	GB21A	1:25	BOV2058	FITC diferente-32501	1:50

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

¹ Bethyl, ²Washington State University

Figura 3 - Citômetro de Fluxo FACSCalibur - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Quadro 8 - Ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue de bezerras da raça Holandesa - São Paulo - 2014

	Anticorpos Monoclonais Primários	Especificidade	Momentos analisados
Branco	-	-	M0 a M5
Compensações	CD3-FL2	Linfócito T	M0 a M5
	GAMMA DELTA-FL1	Linfócito T gamma delta	M0 a M5
	CD45-FL1	Leucócitos totais	M0 a M1
	CD45RO-FL2	Leucócitos de memória	M0 a M1
	MHCII-FL1	Células apresentadoras de Antígenos	M0 a M5
	CD14-FL2	Monócitos	M0 a M5
Ensaio 1	CD3 ⁺ GAMMA DELTA	Linfócitos T e linfócitos T gamma-delta	M0 a M5
Ensaio 2	CD45 ⁺ CD45RO	Leucócitos totais e de memória	M0 a M1
Ensaio 3	CD14 ⁺ MHCII	Monócitos e Células apresentadoras de Antígenos	M0 a M5

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Nessa etapa, foi possível selecionar a população de células pelo seu tamanho - *forward scatter* (FSC) e granulosidade - *side scatter* (SSC). Foram adquiridas cinquenta mil células no citômetro de fluxo para linfócitos B e monócitos e dez mil para as demais células. As células foram avaliadas quanto à fluorescência emitida pelos anticorpos secundários utilizando-se o programa FlowJo[®], versão 7.2.5 (Figuras 4 a 7).

Os resultados foram expressos em porcentagem do gate de células positivas para cada marcador. O número absoluto de cada subpopulação foi calculado pela

porcentagem adquirida por meio da imunofenotipagem dentro do valor total de linfócitos ou mononucleares obtidos a partir do leucograma.

Figura 4 - Etapas inicialmente executadas para análise dos eventos no software Flowjo, obtidos nos ensaios de citometria de fluxo - São Paulo - 2014

(a)

(b)

(c)

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: (a) tubo branco não marcado; (b) seleção da população de linfócitos; (c) seleção da população de células mononucleares.

Figura 5 - Ensaio de avaliação leucócitos totais e de memória - São Paulo - 2014

(a)

(b)

(c)

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014)

Legenda: (a) histograma demonstrando a população $CD45^+(FL1^+)$; (b) a população $CD45RO^+(FL2^+)$; (c) plotagem das células expressando os marcadores $CD45^+CD45RO^+$ no quadrante duplo positivo (circulada).

Figura 6 - Ensaio de avaliação linfócitos T-gamma delta - São Paulo - 2014

(a) (b) (c)

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: (a) histograma demonstrando a população $CD3^+$ (FL2); (b) a subpopulação T gamma delta $^+$ (FL1); (c) plotagem das células expressando os marcadores $CD3^+$ gamma delta $^+$ no quadrante duplo positivo (circulada).

Figura 7 – Ensaio de avaliação das células apresentadoras de antígenos (monócitos) - São Paulo - 2014

(a) (b) (c)

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: (a) histograma demonstrando a população $CD14^+$ (FL2+); (b) a população expressando MHC II+ (FL1+); (c) e células expressando a dupla marcação $CD14^+$ MHCII+ no quadrante duplo positivo (circulada).

3.5.2 Hemograma

Os componentes hematológicos (hemácias, *Red Blood Cells*-RBC; hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio- VCM, Hemoglobina Corpuscular Média- HCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média- HCM e leucócitos totais) foram obtidos por sistema automático⁵. A contagem diferencial de

⁵ BC 2800Vet®

leucócitos foi realizada observando-se as características morfológicas das células por microscopia óptica, aumento de 1000x.

3.5.3 Avaliação da resposta funcional dos leucócitos mononucleares do sangue para o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e BoHV-1

3.5.3.1 Preparo dos estímulos

Bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de vacas com mastite foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Nilson Roberti Benites do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ/USP. O vírus BoHV-1 foi doado pela pesquisadora Dra. Edviges Maristela Pituco do Laboratório de Viroses dos Bovinos do Instituto Biológico.

As bactérias foram semeadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion* - Anexo C) e incubadas por 18 horas em estufa à 37°C. Após, foram centrifugadas à 428G, por 10 minutos, lavadas e ressuspendidas em (1mL) PBS de bactérias (Anexo D). A concentração da solução bacteriana foi ajustada de acordo com a escala de McFarland. A solução estoque de bactérias foi aliquoteada (50µL) em microtubos contendo $1,5 \times 10^7$ (1:10) e $7,5 \times 10^7$ (1:50) de bactérias. Em seguida, os microtubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado, e o *pellet* de bactérias ressuspendido em 50µL de meio de cultivo celular RPMI suplementado (*Roswell Park Memorial Institute* - Anexo E). As bactérias foram inativadas em banho maria à 60°C por 30 minutos consecutivos. Para confirmação da inativação, uma alíquota das bactérias foi semeada em meio ágar sangue de carneiro 5%, incubada em estufa à 37°C e analisada com 24, 48 e 72 horas (Figura 8).

As doses do vírus foram encaminhadas para a FMVZ/USP em criotubos com capacidade máxima de 1mL contendo $10^{5,7}$ TCID₅₀/50µL (50% *Tissue Culture Infective Doses*) de BoHV-1 em 500µL de meio MEM (Meio Essencial Mínimo) modificado⁶, contendo bicarbonato de sódio, glutamina, antibiótico e 25mM de

⁶ MEM, Cultilab®

Hepes⁷. A inativação das aliquotas do vírus foi realizada em banho maria a 56°C por 30 minutos. Posteriormente foi realizada a passagem do vírus em cultivo celular para avaliar sua infectividade pelo efeito citopático (ECP) visível na monocamada de células MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*) em placas de cultivo, verificada em microscópio invertido. A potência do vírus foi observada na retrotitulação por meio do cálculo do título de acordo com Reed e Muench (1938).

Os estímulos ajustados *Staphylococcus aureus* (1:10 e 1:50), *Escherichia coli* (1:50) e BoHV-1 ($10^{5,7}$ TCID₅₀) foram aliquotados em criotubos.

Figura 8 - Placa com meio ágar sangue de carneiro 5%, demonstrando a ausência de crescimento bacteriano após a inativação do *Staphylococcus aureus* - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

3.5.3.2 Cultivo celular

As amostras de sangue obtidas em seringas com capacidade de 60mL contendo EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) foram homogeneizadas por inversão vinte vezes. As amostras foram processadas em até três horas após sua

⁷ Hepes, Sigma®

colheita. Posteriormente, o sangue foi delicadamente transferido para quatro tubos cônicos de poliestireno de 15mL. Em seguida, foram centrifugados a 800G, durante 20 minutos, a 4°C, *no break*. Após, o plasma foi desprezado e o anel celular de leucócitos foi retirado utilizando-se pipetas *Pasteur*. O *pool* de leucócitos restante foi transferido para um tubo cônico de 50mL e preenchido com PBS até a sua capacidade máxima. A mistura foi centrifugada a 800G, durante 10 minutos, a 4°C, *no break*.

A centrifugação permitiu a formação de duas camadas, compostas pela fração líquida e o *pellet* celular. As células do *pellet* foram reservadas e adicionado 10mL de PBS para homogeneização das mesmas. Em seguida, o volume foi reajustado para 40mL também com PBS. Esta suspensão celular foi adicionada sobre 10mL de *Histopaque*⁸ (d=1.083) utilizando uma seringa de 60mL e uma agulha 40x12.

Em seguida, o tubo foi centrifugado a 750G, durante 30 minutos, a 4°C, *no break*. A centrifugação permitiu a separação da mistura em quatro fases: PBS, uma camada rica em células mononucleares (MN), *Histopaque* e polimorfonucleares (PMN). O PBS foi retirado com uma pipeta *Pasteur*. E os mononucleares foram reservados e ressuspensos em 10mL de PBS e o volume ajustado para 50mL, a suspensão foi lavada por centrifugação a 800G, durante 5 minutos, a 4°C.

Os eritrócitos restantes, após a separação das células mononucleares, foram lisados com solução isotônica. Para tanto, foram adicionados dois mL de NaCl 0,2% (Anexo F) homogeneizados por 20 segundos, e adicionados mais dois mL de NaCl 1,6% (Anexo F), as células mononucleares foram lavadas e ressuspensas em um mL de meio de cultivo celular RPMI suplementado, sendo posteriormente avaliadas quanto a sua viabilidade pela prova de exclusão de Azul de Tripán (Figura 9).

Posteriormente, foram pipetados 50µL da suspensão celular mais 450µL de Azul de Tripán solução uso (Anexo G). Foram pipetados 10µL desta mistura na câmara de Neubauer, contando-se o número de células vivas e mortas em um quadrante da câmara⁹. Posteriormente, a suspensão celular foi ajustada para 5x10⁶ células/mL.

⁸ *Histopaque*, Sigma®

⁹ Número de células vivas/quadrante x Fator de diluição* x fator da Câmara de Neubauer (10⁴) x diluição Azul Trypan - 10

* se a concentração da suspensão celular for muito alta, pode-se diluir a suspensão celular

Figura 9 - Avaliação da viabilidade celular pela prova de exclusão de Azul de Tripan - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Duzentos microlitros da suspensão celular contendo 1×10^6 células foram distribuídos em placas de cultivo celular¹⁰ na ausência (controle negativo) e presença (50 μ L) de estímulos bacterianos e virais inativados (*Staphylococcus aureus* (SA1:10 e SA1:50), *Escherichia coli* (EC1:50) e BoHV-1. Além disto, para controle positivo foi utilizada a *concanavalin A*¹¹ (ConA - Anexo H) (Figura 10). As placas foram mantidas em estufa de CO₂ por três dias a 37°C (Figura 11).

¹⁰ Microteste 96 wells, Becton Dickinson Immunocytometry System®, n° cat. 3799

¹¹ Concanavalin A from Canavalia ensiformis (Jack bean), Sigma®, n° cat. 1001782111

Figura 10 - Preenchimento da placa de cultivo celular para a produção de IFN-gama e IL-4 pelas células mononucleares do sangue das bezerras - São Paulo - 2014

	1	2	3	4	5	6	7	8-12
A	Meio	Célula	Célula + ConA	Célula + BoHV-1	Célula + SA1:10	Célula + SA1:50	Célula + EC1:50	-
B	Meio	Célula	Célula + ConA	Célula + BoHV-1	Célula + SA1:10	Célula + SA1:50	Célula + EC1:50	-
C	Meio	Célula	Célula + ConA	Célula + BoHV-1	Célula + SA1:10	Célula + SA1:50	Célula + EC1:50	-
D	Meio	Célula	Célula + ConA	Célula + BoHV-1	Célula + SA1:10	Célula + SA1:50	Célula + EC1:50	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: Meio: 250µL meio de cultivo celular suplementado; Células: 250µL suspensão celular; Célula + ConA: 200µL suspensão celular + 50µL *concanavalin A*; Célula + *S. aureus*: 200µL suspensão celular + 50µL *Staphylococcus aureus* inativada ressuspensa em meio de cultivo celular.

Figura 11 - Placas de cultivo celular mantidas em estufa de CO₂ por três dias a 37°C - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

O sobrenadante dos poços foi aspirado no terceiro dia de incubação do cultivo celular e congelado a -80°C para a determinação das concentrações de IFN-gamma¹² e IL-17¹³ por meio de testes imunoenzimáticos comerciais.

¹² Bovine IFN-gamma DuoSet, RD system®, n° cat. DY2300E

¹³ Bovine IL-17A ELISA VetSet, Kingfisher Biotech®, Inc., VS0284B-002

3.6 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.). As análises foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

A distribuição dos dados em relação à curva gaussiana foi testada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição paramétrica foram: FC, FR, TEMP, eritrograma, leucograma e imunofenotipagem. As variáveis que apresentaram distribuição não paramétrica foram: turgor, TPC e teste imunoenzimático.

Os dados paramétricos estão representados pelas medidas de média e desvio padrão, e os não paramétricos pela mediana e valores mínimos e máximos. A comparação entre os grupos para as variáveis paramétricas e não paramétricas foi realizada pelo teste T e Mann-Whitney, respectivamente.

A análise no tempo (M0 ao M5) foi avaliada por cálculos de ANOVA para medidas repetidas diante de dados com distribuição normal, ou Friedman associado ao Wilcoxon com correção de Bonferroni ($P \leq 0,003$) para dados não paramétricos.

Dados qualitativos estão apresentados em valores absolutos e frequências e os grupos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado.

4 RESULTADOS

Este trabalho avaliou a influência das células do colostro no desenvolvimento de bezerras Holandesas por meio de avaliações clínicas, hematológicas e imunológicas.

4.1 QUALIDADE DO COLOSTRO

Foi realizada a contagem das células somáticas (CCS) do grupo COL⁺ por microscopia direta, sendo possível determinar um valor médio de 1.895.844 células/mL de colostro fresco. A CCS não pode ser realizada no *pool* de colostro congelado, considerando que as células foram destruídas pelo processo de congelamento.

A avaliação indireta da concentração de Igs do colostro administrado para as bezerras COL⁺ e COL⁻ foi avaliada por meio de colostrômetro. Foi possível determinar amplitudes de variação entre 80 e 120g/L de Igs no colostro das vacas COL⁺; e 70 a 120g/L para as vacas COL⁻.

Os valores encontrados para as taxas de anticorpos no colostro fornecido ao COL⁺ e COL⁻ não apresentaram diferença estatística entre si ($P=0,443$) (Figura 12).

Figura 12 - Concentração de Igs no colostro, determinadas por meio de colostrômetro, fornecido às bezerras COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

4.2 EXAME CLÍNICO GERAL

Os valores médios para as funções vitais estão apresentados na tabela 1 e figuras 13 a 15.

Foi possível detectar diferenças nos parâmetros vitais, entre os grupos experimentais, apenas para a frequência cardíaca- FC (bpm), observando-se maior valor médio para o COL⁻ (179,0 bpm) em relação ao COL⁺ (144,3 bpm) no M0. Foram obtidas diferenças em relação aos momentos para a frequência cardíaca entre M0 e M4 e respiratória- FR, observando-se decréscimo dos valores médios no primeiro mês de vida (Tabela 1).

Os parâmetros de temperatura (TEMP) não demonstram oscilações significantes durante todo período experimental.

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão para frequências cardíaca, frequências respiratória e temperatura retal das bezerras recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014

M(s)	FC (bpm)			FR (mpm)			TEMP (°C)		
	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP		MÉDIA±DP	MÉDIA±DP		MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	
M0	144,3±21,1	179,0±28,9e	0,01	50,2±14,2b	54,8±8,7	0,47	38,6±0,8	38,6±0,5	0,77
M1	145,3±17,2d	147,6±38,1	0,95	78,7±25,3e, f	80,2±20,7e, f	0,75	39,0±0,6	38,9±0,7	0,51
M2	139,1±38,5	143,8±25,7	0,91	51,6±8,5	57,4±20,4	0,39	39,1±0,5	39,2±0,4	0,84
M3	120,4±14,1	136,0±28,9	0,32	54,4±11,8	61,8±10,9e, f	0,10	38,7±0,4	39,0±0,3	0,10
M4	122,6±25,6	113,8±22,0	0,36	40,9±9,5	44,0±6,3	0,5	38,6±0,4	38,7±1,0	0,68
M5	127,1±20,5	136,6±22,5	0,48	40,1±11,7	43,4±10,5	0,53	38,7±0,5	38,8±0,4	0,79

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos, sendo (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5, quando $P < 0,05$. Diferença entre os grupos para cada parâmetro quando $P < 0,05$.

Figura 13 - Valores médios para a frequência cardíaca (FC), das bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 14 - Valores médios para a frequência respiratória (FR) das bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 15 - Valores médios para a temperatura (TEMP) das bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

O número e frequência das demais variações obtidas por meio do exame clínico estão expressos na tabela 2.

O tempo de preenchimento capilar (segundos) apresentou amplitude de variação entre 1 e 4 segundos, porém não foi possível detectar diferenças entre grupos ($P=0,082$) do M0 ao M5.

O turgor cutâneo apresentou amplitude de variação entre 1 e 3 segundos, porém não foi detectada variações entre grupos ($P=0,305$) durante o primeiro mês de vida.

Os linfonodos mandibulares, parotídeos, cervicais superficiais e subilíacos foram classificados de acordo com a presença ou ausência de aumento de volume. Foram encontradas alterações no exame das bezerras em pelo menos um dos linfonodos examinados nos momentos M1, M3 e M5 para o COL⁻; e M2, M3 e M5 no COL⁺, sendo que o linfonodo mais acometido foi o subilíaco, seguido do cervical superficial e mandibular. Não foi possível detectar diferença entre os grupos ($P=0,171$).

As mucosas oculares róseas foram consideradas normais. As frequências obtidas para bezerras apresentando mucosas avermelhadas foram de 50% COL⁻ e 55,6% no COL⁺ em M0. No M1 as alterações foram de mucosas avermelhadas e brancas. Do M2 ao M5, as alterações encontradas foram somente de mucosas brancas. Foi possível observar diferenças entre os grupos ($P=0,052$).

A presença da desidratação nas bezerras foi considerada quando apresentaram perdas de líquidos corpóreos acima de 5%. Foi possível detectar dois casos de desidratação leve no COL⁺ (M4, $P=0,329$) e COL⁻ (M5, $P=0,368$).

A diarreia foi registrada quando as bezerras apresentaram escores de fezes equivalentes a 2 ou 3. No M1, foi observado apenas um caso de diarreia em cada grupo. As frequências de diarreias aumentaram do M2 ao M5 em ambos os grupos experimentais ($P=0,418$), porém o número de animais apresentando escore 3 de fezes foi maior no COL⁻.

Broncopneumonia foi considerada quando a soma dos escores segundo a sintomatologia foi ≥ 5 (MCGUIRK, 2008). Foi detectado apenas um caso de broncopneumonia em M4 no COL⁻.

Inflamações umbilicais foram detectadas em três bezerras em M3 ($n=2$) e M5 ($n=1$) no COL⁻.

Tabela 2 - Valores absolutos (relativos- %) para TPC, Turgor Cutâneo (T.C.), Linfonodos (L), mucosas (M), desidratação (D) e escore de fezes (E.F.) manifestados pelas bezerras dos grupos COL⁺ e COL⁻ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014

Variáveis	Parâmetros	M0		M1		M2		M3		M4		M5	
		COL ⁺	COL ⁻	COL ⁺	COL ⁻	COL ⁺	COL ⁻	COL ⁺	COL ⁻	COL ⁺	COL ⁻	COL ⁺	COL ⁻
TPC	≤ 2 segundos	7,0 (77,8)	10,0 (100,0)	8,0 (88,9)	8,0 (80,0)	6,0 (66,7)	10,0 (100,0)	7,0 (77,8)	9,0 (90,0)	8,0 (88,9)	9,0 (90)	7,0 (77,8)	10,0 (100,0)
	> 2 segundos	2,0 (22,2)	0,0 (0,0)	1,0 (11,1)	2,0 (20,0)	3,0 (33,3)	0,0 (0,0)	2,0 (22,2)	1,0 (10,0)	1,0 (11,1)	1,0 (10,0)	2,0 (22,2)	0,0 (0,0)
	P (Qui-quadrado)	0,17		0,51		0,08		0,45		0,59		0,17	
	≤ 2 segundos	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	8,0 (88,9)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	8,0 (88,9)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	9,0 (90,0)	9,0 (100,0)	9,0 (90,0)
T.C.	> 2 segundos	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (11,1)	0 (0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (11,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (10,0)	0,0 (0,0)	1,0 (10,0)
	P (Qui-quadrado)	0,31		0,33		0,31		0,33		0,37		0,37	
	Normal	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	9,0 (90,0)	7,0 (77,8)	10,0 (100,0)	8,0 (88,9)	8,0 (80,0)	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	6 (66,7)	9,0 (90,0)
	Alterado	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (10,0)	2,0 (22,2)	0,0 (0,0)	1,0 (11,1)	2,0 (20,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	3 (33,3)	1,0 (10,0)
L	P (Qui-quadrado)	0,31		0,37		0,17		0,51		0,31		0,27	
	Róseas	4,0 (44,4)	5,0 (50,0)	6,0 (66,7)	5,0 (50,0)	7,0 (77,8)	9,0 (90,0)	5,0 (55,6)	4,0 (40,0)	8 (88,9)	4,0 (40,0)	5,0 (55,6)	7,0 (70,0)
	Alteradas	5,0 (55,6)	5,0 (50,0)	3,0 (33,3)	5,0 (50,0)	2,0 (22,2)	1,0 (10,0)	4,0 (44,4)	6,0 (60,0)	1 (11,1)	6,0 (60,0)	4,0 (44,4)	3,0 (30,0)
	P (Qui-quadrado)	0,57		0,45		0,45		0,31		0,05		0,48	
M	Normais	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	8 (88,9)	10,0 (100,0)	9,0 (100,0)	9,0 (90,0)
	Desidratadas	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1 (11,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (10,0)
	P (Qui-quadrado)	0,31		0,31		0,31		0,31		0,33		0,37	
	Escore 0 e 1	9,0 (100,0)	10,0 (100,0)	8,0 (88,9)	9,0 (90,0)	4,0 (44,4)	3,0 (30)	2,0 (22,2)	4,0 (40,0)	4,0 (44,4)	5,0 (50,0)	5,0 (55,6)	5,0 (50,0)
D	Escore 2 e 3	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (11,1)	1,0 (10,0)	5,0 (55,6)	7,0 (70)	7,0 (77,8)	6,0 (60,0)	5,0 (55,6)	5,0 (50,0)	4,0 (44,4)	5,0 (50,0)
	P (Qui-quadrado)	0,31		0,59		0,48		0,42		0,57		0,57	
	E.F.	0,31		0,59		0,48		0,42		0,57		0,57	

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

4.3 HEMOGRAMA

4.3.1 Eritrograma

Os valores médios e desvios padrão de hemácias (RBC), hemoglobinas (HGB) e hematócrito (HCT), estão apresentados na tabela 3 e figuras 16 a 18.

A comparação entre os grupos (COL⁺ e COL⁻) permitiu a detecção de diferença no M3 para a variável RBC e HGB observando-se nesta última maiores valores (9,6g/dL) no COL⁺ em relação ao COL⁻ (8,3g/dL).

Em relação aos momentos, foi possível observar redução dos valores médios dos teores de RBC, HGB e HCT. A comparação múltipla entre os momentos pode ser observada na tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão para as variáveis hemácias (RBC), hematócrito (HCT) e hemoglobina (HGB) em bezerras Holandesas recém-nascidas do COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

M(s)	RBC ($\cdot 10^6/\mu\text{L}$)			HGB (g/dL)			HCT (%)		
	COL ⁺	COL ⁻	P*	COL ⁺	COL ⁻	P*	COL ⁺	COL ⁻	P*
M0	7,6 $\pm$ 1,0b	7,6 $\pm$ 0,7 b, d, e	0,912	11,3 $\pm$ 1,7 e, f	11,1 $\pm$ 1,6 b, d, e, f	0,842	36,9 $\pm$ 5,0 b, c, d, e, f	36,1 $\pm$ 5,4 b, c, d, e, f	0,75
M1	6,7 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 0,8	0,385	9,7 $\pm$ 1,1	9,0 $\pm$ 1,4e, f	0,268	30,2 $\pm$ 3,3	28,1 $\pm$ 4,5e, f	0,272
M2	7,1 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 1,0	0,695	10,0 $\pm$ 1,2	9,7 $\pm$ 2,1e, f	0,574	30,1 $\pm$ 3,8	29,4 $\pm$ 6,2e, f	0,606
M3	7,2 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 0,8	0,053	9,6 $\pm$ 1,3	8,3 $\pm$ 1,4	0,044	29,2 $\pm$ 3,7	25,4 $\pm$ 4,6	0,060
M4	7,3 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,7	0,087	8,8 $\pm$ 1,0	7,7 $\pm$ 1,3	0,104	26,9 $\pm$ 3,4	23,0 $\pm$ 4,0	0,113
M5	7,5 $\pm$ 1,3	6,1 $\pm$ 1,5	0,102	8,8 $\pm$ 1,6	7,2 $\pm$ 1,3	0,065	26,1 $\pm$ 5,1	20,6 $\pm$ 5,4	0,074

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5. (*) P<0,05 entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Figura 16 - Valores médios para hemácias (RBC), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 17 - Valores médios para os teores de hemoglobina (HGB), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 18 - Valores médios para hematócrito (HCT), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

A comparação entre os grupos para os índices hematimétricos não revelou diferenças entre si. Em relação aos momentos, foi possível observar diminuição dos valores médios do volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), em contrapartida a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) aumentou no primeiro mês de vida. A comparação múltipla entre os momentos pode ser visualizada na tabela 4 e figuras 19 a 21.

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão para os índices hematimétricos em bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

M(s)	VCM			HCM			CHCM		
	COL ⁺	COL ⁻	P*	COL ⁺	COL ⁻	P*	COL ⁺	COL ⁻	P*
M0	48,5±1,7 b, c, d, e, f	47,7±3,7 b, c, d, e, f	0,389	14,7±0,6 d, e, f	14,6±0,8 d, e	0,611	30,5±0,8 b, c, d, e, f	30,7±1,1 b, c, d, e	0,249
M1	45,4±1,2 c, d, e, f	44,4±3,6 c, d, e	0,224	14,5±0,6 d, e, f	14,2±1,0 e	0,224	32,2±0,7 c	32,1±1,2	0,942
M2	42,6±1,9 d, e, f	41,7±3,5 e, f	0,386	14,2±0,6 d, e, f	13,7±1,3 e	0,277	33,4±0,8	33,0±0,8	0,349
M3	40,5±2,1	39,1±3,4	0,261	13,2±0,8 e, f	12,7±0,9	0,119	32,8±1,0	32,7±0,9	0,935
M4	37,0±2,3	35,7±3,2	0,319	12,1±0,7	11,8±1,0	0,339	32,9±0,6	33,2±0,8	0,463
M5	35,1±2,7	34,0±3,2	0,52	11,9±1,2	12,4±3,9	0,702	33,9±1,3	36,4±7,9	0,347

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5. (*) P<0,05 entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Figura 19 - Valores médios para o volume corpuscular médio (VCM), em bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 20 - Valores médios da hemoglobina corpuscular média (HCM), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 21 - Valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Anemias foram detectadas durante todo período experimental (Tabela 5). O grupo COL⁻ apresentou maior número e frequência de anemias em M4 ($P=0,033$) e M5 ($P=0,019$).

Tabela 5 - Interpretação dos eritogramas de acordo com os valores estabelecidos para bezerras por BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND (2006) - São Paulo - 2014

G	B	M1 (1-2d)	M2 (7d)	M3 (14d)	M4 (21d)	M5 (28d)
COL ⁺	2	SA	SA	anemina normocítica normocrômica	SA	SA
	3	SA	SA	SA	SA	SA
	4	SA	SA	SA	SA	SA
	11	anemina macrocítica hipocrômica	anemina normocítica hipocrômica	anemina macrocítica hipocrômica	SA	SA
	12	SA	SA	SA	SA	SA
	15	SA	SA	SA	SA	SA
	16	anemina macrocítica hipocrômica	SA	SA	SA	SA
	19	SA	SA	SA	SA	SA
	23	SA	SA	SA	SA	SA
	1	anemina macrocítica hipocrômica	SA	SA	SA	anemina normocítica normocrômica
COL ⁻	5	SA	SA	SA	SA	SA
	6	anemina normocítica hipocrômica	anemina normocítica hipocrômica	anemina normocítica hipocrômica	anemina microcítica hipocrômica	anemina microcítica normocrômica
	7	SA	SA	anemina normocítica hipocrômica	SA	SA
	8	SA	SA	anemina normocítica hipocrômica	anemina microcítica normocrômica	anemina macrocítica normocrômica
	9	SA	SA	SA	SA	SA
	10	SA	SA	SA	SA	SA
	13	SA	SA	anemina normocítica normocrômica	anemina microcítica normocrômica	anemina microcítica normocrômica
	14	SA	SA	SA	SA	SA
	21	anemina normocítica normocrômica	SA	anemina normocítica hipocrômica	anemina normocítica normocrômica	anemina normocítica normocrômica

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: G- grupos; B- bezerras; M- momentos; SA- sem alteração. M0: ausência de bezerras anêmicas.

4.3.2 Leucograma

Os valores médios e desvio padrão para leucócitos totais (*White Blood Cells*-WBC), neutrófilos (NEUTR) e linfócitos (LINF) estão apresentados na tabela 6 a 7 e figuras 22 a 26. As variáveis monócitos, basófilos e eosinófilos apresentaram valores reduzidos nos diferentes momentos avaliados, além disso, não apresentaram distribuição normal. Assim, optou-se pela apresentação descritiva dos dados em mediana e valores mínimos e máximos (Tabela 8 e Figuras 27 e 28).

Bezerras COL⁺ e COL⁻ apresentaram pico máximo do WBC no M2, observando-se diminuição dos valores nos momentos subsequentes até M4, de maior intensidade nos animais que receberam colostro com células. No M5 detectou-se o menor valor médio de WBC para o COL⁻, em contrapartida, bezerras COL⁺ apresentaram aumento no número dessas células.

Bezerras COL⁺ apresentaram aumento no número de NEUTR em M2, observando queda brusca entre M2 e M4. O COL⁻ apresentou valores médios decrescente do M0 ao M5.

A comparação entre os grupos COL⁺ e COL⁻ para WBC, NEUTR e LINF não possibilitou a detecção de diferenças entre si, exceto para linfócitos em M0 e M2. A comparação múltipla entre os momentos pode ser visualizada na tabela 6.

Figura 22 - Valores de concentração de leucócitos totais (WBC), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 23 - Valores de concentração de neutrófilos (NEUTR), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 24 - Valores de concentração de linfócitos (LINF), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 25 - Valores relativos de concentração de neutrófilos (NEUTR), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 26 - Valores relativos de concentração de linfócitos (LINF), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Tabela 6 - Valores absolutos das variáveis relacionadas aos leucócitos totais (WBC), neutrófilos (NEUTR) e linfócitos (LINF) do leucograma em relação aos momentos estudados - São Paulo - 2014

MOMENTOS	WBC($10^3/\mu\text{L}$)			NEUTR($10^3/\mu\text{L}$)			LINF($10^3/\mu\text{L}$)		
	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	10,8±2,8	11,4±4,2f	0,710	8,0±2,3e, f	7,8±3,6f	0,930	2,7±1,0d, e	3,4±1,0e	0,005
M1	10,2±6,2	9,6±4,2	0,817	7,8±6,0	6,6±3,6	0,664	2,2±1,1	2,6±0,9e, f	0,596
M2	12,1±5,5	11,8±5,8	0,829	8,2±5,3	6,3±4,1	0,389	3,8±1,0	5,4±2,2	0,017
M3	8,3±2,8	9,5±4,2	0,383	3,5±2,0	5,0±3,3	0,244	4,6±1,3	4,3±1,2	0,841
M4	7,7±3,6	9,6±3,2	0,416	3,1±3,0	4,6±2,7	0,476	4,4±0,9	4,9±1,2	0,346
M5	9,2±4,1	6,9±1,7	0,221	3,5±2,0	2,5±1,1	0,316	5,5±2,1	4,2±1,0	0,175

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5. (*) $P < 0,05$ entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Tabela 7 - Valores relativos das variáveis relacionadas aos leucócitos totais (WBC), neutrófilos (NEUTR) e linfócitos (LINF) do leucograma em relação aos momentos estudados - São Paulo - 2014

MOMENTOS	NEUTR(%)			LINF(%)		
	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	72,1±10,2e, f	67,2±9,3e, f	0,315	26,1±10,1d, e, f	30,8±9,7c, e, f	0,349
0,0,M1	67,4±22,0e, f	64,0±13,9e, f	0,720	30,7±21,1e, f	31,0±12,0e, f	0,989
M2	62,2±14,5e, f	49,6±12,6	0,090	36,5±14,5d, e, f	49,7±12,5	0,089
M3	40,2±13,9	49,3±11,9	0,215	57,4±12,6	49,1±11,8	0,221
M4	35,5±16,1	44,3±14,9	0,414	63,0±16,5	54,8±15,3	0,473
M5	36,7±7,3	35,3±12,2	0,718	61,9±7,8	62,6±12,4	0,821

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5. (*) P<0,05 entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Figura 27 - Valores absolutos das medianas de concentração de monócitos ($10^3/\mu\text{L}$), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 28 - Valores relativos das medianas de concentração de monócitos (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Tabela 8 - Valores relativos (%) e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) das medianas, e valores mínimo e máximo das variáveis monócitos, basófilos e eosinófilos - São Paulo - 2014

Valores relativos(%)													
		M0		M1		M2		M3		M4		M5	
		COL+	COL-	COL+	COL-	COL+	COL-	COL+	COL-	COL+	COL-	COL+	COL-
MONÓCITOS	MEDIANA	1,00	1,00	0,00	3,00	1,00	0,00	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
	MINIMO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MÁXIMO	1,00	3,00	4,00	9,00	4,00	1,00	8,00	4,00	2,00	2,00	3,00	4,00
BASÓFILOS	MEDIANA	1,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	MINIMO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MÁXIMO	3,00	1,00	3,00	5,00	1,00	2,00	3,00	2,00	2,00	1,00	4,00	3,00
EOSINÓFILOS	MEDIANA	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MINIMO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MÁXIMO	1,00	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Valores absolutos($10^3/\mu\text{L}$)													
MONÓCITOS	MEDIANA	0,08	0,12	0,00	0,20	0,05	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
	MINIMO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MÁXIMO	0,16	0,45	0,23	1,00	0,31	0,22	0,86	0,29	0,15	0,24	0,30	0,26
BASÓFILOS	MEDIANA	0,08	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
	MINIMO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MÁXIMO	0,47	0,13	0,17	0,20	0,14	0,41	0,22	0,16	0,18	0,12	0,33	0,30
EOSINÓFILOS	MEDIANA	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MINIMO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MÁXIMO	0,16	0,26	0,23	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,10	0,00

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

4.4 SUBPOPULAÇÕES E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

Os valores médios absolutos e relativos para as diferentes subpopulações de linfócitos (CD45⁺) de memória (CD45RO⁺), linfócitos (CD3⁺) gamma-delta (GD⁺) e monócitos (CD14⁺) apresentadores de antígenos (MHCII⁺) estão descritas nas tabelas 9 a 11 e figuras 29 a 38.

4.4.1 Linfócitos T (CD3) gamma-delta (GD)

Os valores relativos das subpopulações de linfócitos CD3⁺gamma-delta⁻ e CD3⁺gamma-delta⁺ não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais. Em contrapartida, foi possível detectar diferenças entre os grupos para os valores absolutos no M0 e M2.

As proporções de CD3⁺gamma-delta⁻ aumentaram no decorrer do estudo, em contrapartida as células CD3⁺gamma-delta⁺ foram menores em M5 em relação ao M0-M3.

Com relação aos momentos foi possível detectar diferença para CD3⁺gamma-delta⁻ no M1 entre M4 no COL⁻.

Tabela 9 - Valores relativos (%) e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD3 e Gamma-delta no sangue de bezerras Holandesas COL⁺ e COL⁻, no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014

	Valores relativos (%)					
	CD3 ⁺ Gamma-delta ⁻			CD3 ⁺ Gamma-delta ⁺		
Momentos/Grupos	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	35,0±8,9	37,4±9,1	0,247	40,5±10,2	41,0±10,9	0,653
M1	36,5±9,6	38,7±5,9	0,547	38,8±9,4	42,3±8,1	0,519
M2	45,2±8,7	43,0±5,2	0,335	40,8±6,9	44,8±5,2e	0,248
M3	43,7±10,8	41,2±8,1	0,522	41,6±10,6	42,2±5,3	0,948
M4	41,6±8,1	43,3±4,3	0,64	63,8±65,1	36,5±5,9	0,239
M5	48,6±6,5	44,2±9,1	0,291	34,6±9,1	37,8±7,7	0,503
	Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)					
	CD3 ⁺ Gamma-delta ⁻			CD3 ⁺ Gamma-delta ⁺		
Momentos/Grupos	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	988,3±482,3c, f	1279,9±569,0c, e	0,01	1113,8±517,9	1368,5±511,6	0,227
M1	802,0±413,1c, e, f	995,4±328,7c, d, e, f	0,259	835,2±435,8	1146,2±609,6e	0,313
M2	1676,2±380,1f	2263,4±740,9	0,01	1580,6±626,1	2352,2±816,4	0,001
M3	1946,8±618,1	1798,9±637,3	0,699	1925,7±744,2	1824,5±523,9	0,819
M4	1877,8±619,9	2128,6±571,0	0,368	2663,2±2400,2	1822,4±603,2	0,357
M5	2640,7±803,5	1919,6±781,5	0,176	1969,0±1241,4	1575,8±382,8	0,448

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5. (*) $P < 0,05$ entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Figura 29 - Valores relativos de $CD3^+ \text{Gamma-delta}^-$ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 30 - Valores relativos de $CD3^+ \text{Gamma-delta}^+$ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 31 - Valores absolutos de $CD3^+ \text{Gamma-delta}^-$ ($10^3/\mu\text{L}$), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 32 - Valores absolutos de $CD3^+ \text{Gamma-delta}^+$ ($10^3/\mu\text{L}$), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

4.4.2 Linfócitos de memória (CD45⁺CD45RO⁻)

O grupo COL⁻ apresentou maiores valores absolutos para CD45⁺CD45RO⁻ no M0, em relação ao COL⁺. Não foi possível determinar diferenças na expressão do marcador de células de memória (CD45⁺CD45RO⁺) entre as bezerras que receberam o colostro fresco (COL⁺) e congelado (COL⁻) no M1. No entanto, a comparação entre os momentos permitiu detectar diminuição para a população CD45⁺CD45RO⁻ e aumento das células de memória CD45⁺CD45RO⁺ do M0 ao M1 em ambos os grupos experimentais.

Tabela 10 - Valores relativos (%) e absolutos (10³/μL) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD45 e CD45RO no sangue de bezerras Holandesas COL⁺ e COL⁻, nos primeiros dois dias de vida - São Paulo - 2014

	Valores relativos (%)					
	CD45 ⁺ CD45RO ⁻			CD45 ⁺ CD45RO ⁺		
Momentos/Grupos	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	95,2±2,3b	95,0±2,9b	0,685	2,5±1,4b	2,7±1,7b	0,962
M1	69,8±9,8	74,2±11,4	0,454	16,3±3,0	16,7±2,0	0,794
	Valores absolutos (10 ³ /μL)					
	CD45 ⁺ CD45RO ⁻			CD45 ⁺ CD45RO ⁺		
Momentos/Grupos	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	2602,7±941,6	3204,2±998,4b	0,005	66,8±47,6b	92,7±61,7b	0,355
M1	1575,2±844,4	1989,0±847,3	0,359	350,4±146,9	423,9±121,1	0,306

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1. P<0,05 diferença entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Figura 33 - Valores relativos (%) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD45 e CD45RO no sangue de bezerras Holandesas COL⁺ e COL⁻, nos primeiros dois dias de vida - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 34 - Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD45 e CD45RO no sangue de bezerras Holandesas COL⁺ e COL⁻, nos primeiros dois dias de vida - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

4.4.3 Células Mononucleares (CD14MHCII)

Não foi possível observar diferenças entre os grupos para os valores relativos e absolutos das células CD14 e MHCII. Porém, observou-se aumento do número absoluto de células CD14⁺MHCII⁺ no primeiro mês de vida. As comparações múltiplas entre os momentos podem ser observadas na tabela 11.

É importante ressaltar que as bezerras apresentaram maiores proporções de CD14⁺MHCII⁻ do M0 ao M3 em relação ao CD14⁺MHCII⁺ observando inversão do perfil celular em M4-M5 em ambos os grupos experimentais.

Tabela 11- Valores relativos (%) e absolutos (10³/μL) das subpopulações de linfócitos expressando os marcadores CD14 e MHCII no sangue de bezerras Holandesas COL⁺ e COL⁻, no primeiro mês de vida - São Paulo - 2014

	Valores relativos (%)					
	CD14 ⁺ MHCII ⁻			CD14 ⁺ MHCII ⁺		
Momentos/Grupos	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	29,0±17,2	20,8±8,1	0,128	4,8±2,7	3,4±2,2	0,291
M1	34,6±25,9	28,9±25,1	0,319	2,6±2,7	5,0±5,9	0,289
M2	23,6±15,5	17,5±7,1	0,292	5,0±3,8	7,3±7,8	0,328
M3	26,3±14,0	27,5±11,4	0,911	6,3±5,6	5,4±3,7	0,546
M4	27,3±18,1	27,0±14,9	0,908	29,7±14,5	26,1±10,6	0,11
M5	20,9±15,0	31,7±19,2	0,076	31,0±16,3	32,0±14,0	0,804
	Valores absolutos (10 ³ /μL)					
	CD14 ⁺ MHCII ⁻			CD14 ⁺ MHCII ⁺		
Momentos/Grupos	COL ⁺	COL ⁻	P	COL ⁺	COL ⁻	P
M0	816,8±536,3	721,2±357,2	0,53	132,2±80,6e, f	119,2±84,1e, f	0,789
M1	853,6±667,4	865,2±853,8	0,511	57,8±57,5e, f	149,3±206,2e, f	0,286
M2	879,3±596,0	853,2±308,6	0,952	182,6±122,1e, f	355,0±350,2e, f	0,172
M3	1232,6±838,9	1215,8±647,6	0,894	313,2±341,7	221,7±143,9e, f	0,345
M4	1160,5±858,5	1395,4±981,0	0,633	1346,8±745,0	1285,8±613,7	0,608
M5	1117,3±870,9	1364,9±918,8	0,404	1605,9±978,5	1334,6±558,9	0,321

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: letras minúsculas demonstram diferença com relação aos (a) valores diferentes do M0; (b) valores diferentes do M1; (c) valores diferentes do M2; (d) valores diferentes do M3; (e) valores diferentes do M4; (f) valores diferentes do M5. (*) P<0,05 entre os grupos COL⁺ e COL⁻.

Figura 35 - Valores relativos de $CD14^+ MHCII^-$ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 36- Valores relativos de $CD14^+ MHCII^+$ (%), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 37 - Valores absolutos de $CD14^+ MHCII^-$ ($10^3/\mu L$), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Figura 38 - Valores absolutos de $CD14^+ MHCII^+$ ($10^3/\mu L$), no sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas COL^+ e COL^- - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

4.5 ATIVIDADE FUNCIONAL DAS CÉLULAS MONONUCLEARES SANGUÍNEAS PARA ANTÍGENOS BACTERIANOS E BoHV-1

Não foi possível realizar o cultivo celular nos momentos M0 e M1, devido ao baixo rendimento celular encontrado no sangue das bezerras recém-nascidas.

Os valores médios para as citocinas produzidas pelos leucócitos mononucleares estão apresentados na tabela 12 e figuras 39 e 40.

As células mononucleares quando não estimuladas ou estimuladas com BoHV-1 em ambos os grupos, não apresentaram níveis detectáveis para IFN-gamma e IL-17. As variações das citocinas apresentadas para os grupos revelou perfil diferenciado quando as células foram estimuladas com ConA e bactérias. Apenas as bezerras COL⁺ responderam para a ConA, especialmente no M3 para IFN-gamma e M3 e M5 para IL-17.

Foi possível detectar baixa resposta das células mononucleares para o *S. aureus* 1:10 e 1:50 em relação à produção do IFN-gamma no COL⁺. Entretanto as células das bezerras COL⁻ produziram IFN-gamma quando estimuladas com *S. aureus*.

A IL-17 não foi detectada quando as células foram estimuladas com *S. aureus* 1:10 em ambos os grupos apenas as células mononucleares do COL⁺ responderam aos *S. aureus* 1:50, observando-se pico de produção em M3.

As células responderam com maior intensidade para a *E. coli* em relação ao *S. aureus*. As células do grupo COL⁺ estimuladas com *E. coli* 1:50, apresentaram resposta semelhante para as duas citocinas, com dois picos de produção em M3 e M5. A produção da citocina IFN-gamma pelas células mononucleares das bezerras COL⁻ foi crescente do M2 ao M4 com decréscimo no momento subsequente (M5). Em relação a IL-17, foram observados dois picos em M3 e M5 para ambos os grupos experimentais, porém as concentrações foram de menor magnitude em COL⁻.

A comparação entre os grupos, revelou diferença na concentração de IFN-gamma, quando as células foram estimuladas com *S. aureus* 1:10, com valores maiores no grupo COL⁻ em relação ao COL⁺ (P=0,012) no M4. A interleucina -17 apresentou diferença no M3 quando as células foram estimuladas com ConA (P=0,048), com valores maiores nos no grupo COL⁺. Não foi possível observar diferença entre os momentos em todas as variáveis.

A resposta bacteriana para COL⁺ ocorreu no momento subsequente aos quadros de diarreias (M3), observando-se precocidade para a produção das citocinas IFN-gamma e IL-17 quando as células foram estimuladas com *S. aureus* 1:50 e *E. coli* 1:50. O grupo COL⁻ apresentou resposta inflamatória retardada em M4 para IFN-gamma e valores menores para este grupo em M3 na IL-17.

Tabela 12 - Valores médios das concentrações em pg/mL das citocinas IFN-gamma e IL17 do cultivo celular de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

	IFN-gamma (pg/mL)											
	ConA			<i>S. aureus</i> 1:10			<i>S. aureus</i> 1:50			<i>E. coli</i> 1:50		
	COL+	COL-	P	COL+	COL-	P	COL+	COL-	P	COL+	COL-	P
M2	0,00	166,33	0,592	0,00	0,00	0,206	0,00	0,00	0,958	0,00	209,25	0,728
M3	10375	0,00	0,172	16,75	0,00	0,677	29,25	0,00	0,518	1372	676	0,241
M4	394,33	0,00	0,692	0,00	225,33	0,012	0,00	1370	0,268	0,00	2422	0,136
M5	29766	0,00	0,368	0,00	0,00	0,378	0,00	0,00	0,438	2270	1025	0,807
	IL-17 (pg/mL)											
	ConA			<i>S. aureus</i> 1:10			<i>S. aureus</i> 1:50			<i>E. coli</i> 1:50		
	COL+	COL-	P	COL+	COL-	P	COL+	COL-	P	COL+	COL-	P
M2	145	220	0,738	0,00	0,00	0,358	0,00	45	0,468	1,00	0,00	0,604
M3	740	0,00	0,048	0,00	0,00	0,634	150	0,00	0,963	137200	67600	0,241
M4	160	0,00	0,142	0,00	0,00	0,343	0,00	0,00	0,809	0,00	26735	0,136
M5	1090	0,00	0,317	0,00	0,00	0,289	50	0,00	0,103	118250	102500	0,964

Fonte: (Novo, S. M. F., 2014).

Legenda: Células não estimuladas e estimuladas com BoHV-1 não produziram citocinas entre M2 e M5.

Figura 39 - Valores médios encontrados nas concentrações de ConA (a), *S. aureus* 1:10 (b), *S. aureus* 1:50 (c) e *E. coli* (d), pelo teste imunoenzimático de IFN-gamma do cultivo celular de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: Células não estimuladas e estímulo com BoHV-1 não produziram citocinas entre M2 a M5.

Figura 40 - Valores médios encontrados nas concentrações de ConA (a), *S. aureus* 1:50 (b) e *E. coli* (c), pelo teste imunoenzimático de IL-17 do cultivo celular de bezerras Holandesas recém-nascidas COL⁺ e COL⁻ - São Paulo - 2014

Fonte: (NOVO, S. M. F., 2014).

Legenda: Células não estimuladas e estímulos com *S. aureus* 1:10 e BoHV-1 não produziram citocinas entre M2 a M5.

5 DISCUSSÃO

O colostro bovino contém componentes imunológicos como os leucócitos, citocinas e imunoglobulinas que conferem imunidade passiva aos neonatos (CROSS; GILL, 2000; KORHONEN; MARNILA; GILL, 2000). Watson (1980) sugeriu que os leucócitos do colostro poderiam transferir imunidade celular às bezerras recém-nascidas. Estudos comprovaram a absorção e atividade destas células nos filhotes após ingestão do colostro (ALDRIDGE, MCGUIRK, LUNN, 1998; LIEBERTENÓRIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002; REBER, 2006). No entanto, ainda existem indagações sobre a função das células do colostro nos diferentes mecanismos de imunidade específica para agentes virais e bacterianos envolvidos na patogenia das doenças de bezerras.

5.1 QUALIDADE DO COLOSTRO

A avaliação da celularidade do colostro desta pesquisa foi realizada apenas no grupo COL⁺ para leucócitos totais, devido à lise realizada das células pelo congelamento do colostro fornecido ao grupo COL⁻. Esta análise foi realizada para verificar a quantidade de células recebidas pelas bezerras.

A CCS (1.895.844 células/mL) do colostro obtida neste estudo foi superior ao valor de 878.000 células/mL encontrado por Gomes et al. (2011). Considerando-se a concentração celular obtida, pode-se estimar que as bezerras receberam um total de células de $7,58 \times 10^9$ em quatro litros de colostro. Silva (2014) relatou que o colostro de primeira ordenha apresenta 32% de viabilidade celular, assim pode-se estimar a ingestão de aproximadamente $2,42 \times 10^9$ células viáveis no volume mínimo equivalente a quatro litros de colostro administrado às recém-nascidas.

A concentração de IgG do colostro dos dois grupos experimentais apresentaram valores adequados, segundo o limiar (50g/L) estabelecidos por Chigerwe et al. (2008), Godden (2008), Morril et al. (2012) e Quigley et al. (2013). Assim, é possível afirmar que todas as bezerras deste estudo receberam colostro com teores de IgG acima do ponto de corte recomendado pela literatura.

A ausência de diferenças estatística entre os valores obtidos para a concentração de imunoglobulinas do colostro para o COL⁺ e COL⁻ permitiu a confirmação da padronização da qualidade do colostro fornecido para os dois grupos experimentais.

5.2 EXAME CLÍNICO GERAL

Para selecionar bezerras deste experimento, utilizou-se como critério de inclusão, animais oriundos de partos eutócicos que apresentassem escore APGAR 7 e 8, segundo critérios estabelecidos por Born (1981). O teste APGAR foi realizado entre o nascimento e duas horas de vida devido à distância entre a fazenda e o dormitório da equipe.

As bezerras foram acompanhadas durante 28 dias de vida por meio de exame clínico geral, além dos testes laboratoriais, seguindo os procedimentos descritos por Dirksen, Gründer e Stöber (2008) e McGuirk (2008). Além disto, o grau de hidratação foi avaliado seguindo critérios apresentados por Benesi e Kogiga (2011); o escore de fezes por McGuirk (2008) e o escore de broncopneumonia por Poulsen e McGuirk (2009).

Foi possível encontrar variação entre os grupos no M0 apenas para a FC, no qual o grupo COL⁻ apresentou maiores valores que o COL⁺. Esta variação pode ser justificada pela presença de duas bezerras do COL⁻ que apresentaram FCs elevadas no M0 segundo os valores propostos por Mee (2008) de 100-150bpm para bezerras imediatamente após o parto. Este fato pode ter ocorrido devido à presença de asfixia precoce, pois o teste de APGAR foi realizado tardiamente ao parto. Rodrigues (2008) avaliou bezerras provenientes de partos eutócicos, distócicos e partos estimulados por meio de ocitocina imediatamente após o nascimento e detectou aumento gradativo do escore APGAR entre 5 e 60 minutos pós-parto.

Em relação ao tempo, as médias das frequências cardíacas decresceram do M0 ao M4, com discreto aumento em M5. Silva et al. (2014) também avaliaram bezerros Holandeses recém-nascidos e encontraram valores de $123,00 \pm 2,59$, $86,96 \pm 2,11$ e $102,67 \pm 3,54$ bpm, respectivamente na primeira, segunda e quinta semanas de vida. O aumento da FC ao redor do primeiro mês de vida apresentados

por estes autores também foi detectado nesta pesquisa. Os achados deste estudo concordam também com aqueles apresentados por Piccione et al. (2010) que avaliaram bezerros da raça Limousin e relataram declínio das FCs de $115,50 \pm 2,94$ para $102 \pm 0,75$ bpm, respectivamente, ao nascimento e 30 dias de vida. Piccione et al. (2010) explicaram ainda que os neonatos apresentam volume sistólico baixo imediatamente após o nascimento. Contudo, o coração necessita bombear sangue em uma taxa sistólica maior no sistema cardiovascular, que apresenta uma elevada elasticidade e resistências periféricas. Assim, pela incapacidade de variar o débito cardíaco, o volume sistólico deve ser compensado pelo aumento da FC. Tais fatos justificam o decréscimo dos valores da frequência em reflexo da adaptabilidade dos neonatos ao longo do tempo (PICCIONE et al., 2007).

Dados obtidos com relação à frequência respiratória não demonstraram diferenças entre os grupos COL⁺ e COL⁻ nos momentos avaliados. As FRs detectadas no M0 revelaram valores semelhantes em relação aos intervalos referenciados pela literatura, que consideram valores normais para neonatos bovinos entre 50 a 75 mpm nas primeiras horas pós-nascimento (VARGA et al., 1999; MEE, 2008).

As variações detectadas especialmente nas primeiras avaliações podem ser consequência do período mínimo de pelo menos duas semanas (14 dias) que os neonatos precisam para que as unidades pulmonares estejam integradas na troca gasosa (LINKE; BOSTEDT; RICHTER, 2013). A frequência respiratória apresentou variações principalmente entre M0 e M2, em seguida notou-se, diminuição gradativa do M3 (14 dias) ao M5 (28 dias).

Pesquisas semelhantes com bezerros da raça Limousin (PICCIONE et al., 2010) e cordeiros (DAVEY; JOHNS; HARDING, 1998; PICCIONE et al., 2007) também registraram modificações nas FRs durante o primeiro mês de vida, exibindo a variabilidade homeostática fisiológica durante o período neonatal, bem como o desenvolvimento incompleto das funções anatômicas e funcionais dos neonatos.

Os parâmetros de temperatura retal não demonstraram oscilações significativas entre os grupos e momentos avaliados durante todo o período experimental. A literatura relata que bezerras recém-nascidas precisam rapidamente ativar os mecanismos termogênicos, como o tremor e o metabolismo da gordura marrom. Essa regulação depende do ambiente e da ingestão de colostro, em que a produção de calor aumenta a temperatura corporal, que se estabiliza dentro de 48 e

72 horas (LEONEL, 2009). O perfil constante apresentado para a temperatura nesta pesquisa pode ser justificada pelo rápido fornecimento de colostro após o nascimento. Além disto, as bezerras foram alojadas em casinhas de madeira dentro da maternidade com cama de feno alta e luz artificial.

Os valores encontrados para TPC apresentaram amplitude de variação de 1 a 4 segundos, não foi possível detectar diferenças entre os grupos e momentos analisados. Este parâmetro avalia o tempo de preenchimento capilar, relacionado à desidratação: 1-2 segundos indica animal sadio, 2-4 segundos indica desidratação leve a moderada; e acima de 5 segundos indica desidratação intensa. A detecção esporádica de TPC ≥ 2 segundos em algumas bezerras pode estar associada aos casos de diarreia observados.

Não foi detectada diferença entre os grupos e momentos para turgor cutâneo. No entanto, três animais apresentaram alteração: COL⁺ (n=1) em M1 e M3, e COL⁻ em M4 (n=1) e M5 (n=1). O turgor cutâneo avaliou a elasticidade e a mobilidade da pele que dependem, principalmente, da condição do tecido subcutâneo. Esta variável está alterada em quadros que promovem a perda de líquido e desidratação (DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 2008), sendo possível associar as observações esporádicas com as diarreias.

Mucosas oculares apresentaram-se avermelhadas em algumas bezerras devido M0 e M1 devido à hemoconcentração relatada para neonatos (KNOWLES et al., 2000; MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007). Além disso, as bezerras COL⁻ apresentaram mucosas esbranquiçadas em M4, provavelmente associadas à anemia da inflamação e aos quadros de diarreia, broncopneumonias ou inflamações umbilicais.

A avaliação do grau de hidratação das bezerras revelou casos de desidratação leve no COL⁺ M4 (n=1) e COL⁻ em M5 (n=1). Esses achados estão associados aos quadros de diarreia.

Os linfonodos foram avaliados conforme tamanho e sensibilidade. No COL⁺ foram detectadas alterações no M2, M3 e M5, e no COL⁻ em M1, M3 e M5, não sendo possível encontrar diferença entre os grupos e momento analisados. O linfonodo sublíaco foi o mais acometido, sendo responsável pela drenagem da região posterior do tronco e do segmento craniolateral da coxa (DIRKSEN; GRÜNDER; STÖKER, 2008), assim as inflamações intestinais detectadas poderiam estar associadas ao achado.

O escore de fezes e broncopneumonias das bezerras foi avaliado devido à alta frequência das diarreias e doenças respiratórias em bovinos jovens (BENESI et al., 2012a). Os principais patógenos causadores de diarreias em bezerros neonatos são *Escherichia coli* e viroses representadas por Rotavírus e Coronavírus, respectivamente, encontrados antes e após a primeira semana de vida (GULLIKSEN et al., 2009; BARTELS et al., 2010). Com relação à etiologia da Doença Respiratória Bovina podem estar envolvidos agentes virais e as bactérias *Pausterella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somnus*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma* spp (VOGEL et al., 2001; ANGEL et al., 2009; GRIFFIN et al., 2010).

Nesta pesquisa não foi observada diferença para as frequências de diarreias entre os grupos e momentos avaliados, porém o grupo COL⁻ apresentou maior número de bezerras apresentando o escore de fezes igual a 3. Além disso, as inflamações umbilicais e broncopneumonia ocorreram apenas no COL⁻.

Langel et al. (2015) analisaram o escore de fezes de bezerros Holandeses e Jersey distribuídos em dois grupos que receberam colostro fresco com células ou colostro congelado. Estes autores também não encontraram diferenças para o escore de fezes em relação aos grupos experimentais. A maior taxa de diarreia observada pelos retro-referidos autores foi aos 14 dias de vida, período coincidente com os achados deste experimento.

Langel et al. (2015) também avaliaram o escore de doenças respiratórias, observando maior ocorrência aos 12 dias de vida no COL⁻. Nesta pesquisa detectou-se apenas um caso de broncopneumonia no COL⁻ aos 38 dias de vida.

Os diferentes *status* sanitários apresentados pelos grupos pode estar relacionado com o recebimento de células maternas pela ingestão do colostro e amadurecimento precoce do sistema imune das bezerras COL⁺.

5.3 HEMOGRAMA

5.3.1 Eritrograma

A comparação entre grupos para as variáveis RBC, HGB e HCT permitiu detectar diferença para HGB no M3. Estes componentes do eritrograma apresentaram variações do M3 ao M5, observando-se valores superiores no grupo COL⁺.

Com relação aos momentos foi possível observar nesta pesquisa redução dos parâmetros supracitados. Os maiores valores observados para as três variáveis foi em M0. Tornquist e Rigas (2010) sugeriram que este fato possa ter relação com a maior concentração sérica de proteínas após a ingestão de colostro.

As variações se estabilizaram em M2 e foram decrescentes até o final do período experimental. Baixas concentrações séricas de ferro no recém-nascido provocam impacto na eritropoiese, resultando na diminuição do número de RBC, HCT e HGB com o decorrer da idade (MOHRI et al., 2004; MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007). Estes achados foram encontrados anteriormente em estudo que também realizaram pesquisa longitudinal realizados por Knowles et al. (2000); Mohri; Sharifi; Eidi (2007).

A hemoglobina variou de 8,8 a 11,3g/dL no COL⁺ e de 7,2 a 11,1g/dL no COL⁻. Brun-Hansen, Kampen e Lund (2006) observaram intervalos semelhantes de 8,8 a 12,5g/dL concordando com a amplitude observada nesta pesquisa.

Os índices hematimétricos apresentaram diminuição dos valores para as variáveis VCM e HCM do nascimento (M0) ao M5, sendo os valores do COL⁺ sempre maiores que o COL⁻ exceto para HCM no M5. O CHCM apresentou comportamento crescente acentuado nos dois grupos avaliados COL⁺ e COL⁻ do M3 ao M5 com valores superiores nos dois últimos momentos no COL⁻.

Menores valores de VCM geralmente são encontrados associados a uma elevação no número de hemácias (BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND, 2006), fenômeno observado neste trabalho.

A análise e interpretação conjunta dos componentes do eritrograma confirmam estatisticamente maior frequência de anemias no COL⁻, especialmente nos momentos M4 e M5.

Nestes momentos a maioria das anemias observadas foram normocítica-microcítica e normocrônima-hipocrômica, compatíveis com a anemia do processo inflamatório.

5.3.2 Leucograma

No leucograma não foi possível detectar diferenças entre os grupos COL⁺ e COL⁻ durante o período experimental, exceto para os maiores valores de linfócitos no COL⁻ em M2. Entre os momentos foi possível observar diferença para os leucócitos totais no M0 entre M5 no COL⁻.

Os neutrófilos apresentaram pico máximo no M0 fato que já havia sido relatado por Benesi et al. (2012b). A interpretação do leucograma permite afirmar também que variações foram encontradas em M2, momento que coincide com o início dos quadros de diarreia e anemia e consequentemente com o pico máximo de leucócitos totais. Os grupos apresentaram comportamento diferenciado em relação ao estímulo antigênico caracterizado pela diminuição brusca dos NEUTR de M2 a M5 no COL⁺ que pode sinalizar para uma rápida migração dos NEUTR sanguíneos para o foco inflamatório. Bezerras COL⁻ apresentaram uma diminuição retardada com pico mínimo em M5 podendo assim sugerir a maior intensidade das diarreias (escore de fezes 3) neste momento e grupo. A diminuição dos neutrófilos conforme a idade já havia sido relatada por Mohri, Sharifi e Eidi (2007) que apresentou um declínio de 6 a $2,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ durante o mesmo período que o presente trabalho.

O cortisol estimula a liberação de neutrófilos segmentados e bastonetes pela medula óssea do compartimento estoque para a circulação (TORNQUIST; RIGAS, 2010). Nagahata et al. (2000) sugeriram que o aumento do cortisol sérico poderia resultar em uma diminuição da expressão da L-selectina na superfície dos neutrófilos. Este fato justificaria a diminuição da ligação dessas células com as endoteliais, aumentando o número dos neutrófilos na circulação com redução no compartimento marginal, portanto, o aumento, dos neutrófilos ocorre pela somatória entre os neutrófilos circulantes e aqueles liberados do estoque da medula óssea. Outra hipótese para a neutrofilia seria a estimulação das células-tronco para

proliferação e diferenciação das células mielóides pelo aumento do fator estimulador de colônias de granulócitos (TORNQUIST; RIGAS, 2010).

Com relação aos linfócitos, apresentaram nos dois grupos diferença no M0 entre M4 e no COL⁻ também no M1 entre o M5. Foi possível ainda observar um gradativo aumento dos valores durante o período estudado, corroborando com estudos de Brun-Hansen; Kampen e Lund (2006) que foi de 4 a $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ e Mohri; Sharifi e Eidi (2007) apresentando valores crescentes de 3,5 a $4,5 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Os monócitos nesta pesquisa apresentaram pico máximo em M1 no grupo COL⁻. Esta variação concorda com os dados de Reber et al. (2008b) que no mesmo momento observaram diferença no CD14⁺ entre os grupos analisados. Porém, os valores observados neste estudo mesmo no M1 foram baixos, assim como para as variáveis basófilos e eosinófilos em todos os momentos, estes achados corroboram com Brun-Hansen, Kampen e Lund (2006) e Mohri, Sharifi e Eidi (2007).

5.4 SUBPOPULAÇÕES E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A avaliação da transferência de fatores, como células e citocinas, que estimulam a ativação dos leucócitos mononucleares do sangue das bezerras tem sido avaliada pela técnica de imunofenotipagem (REBER et al., 2006; REBER et al., 2008a,b; LANGEL et al., 2015). Esta técnica permite identificar as populações e subpopulações dos leucócitos mononucleares, assim como avaliar a ativação dessas células mediante a expressão de receptores de membrana como o CD45RO. A análise conjunta do perfil apresentado pode colaborar com o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resposta imune.

A resposta imune específica inicia-se pelo reconhecimento antígeno-específico pelos linfócitos. Células apresentadoras de antígenos como monócitos (CD14⁺), além das células dendríticas, possuem receptores do tipo *Toll-like* que se ligam a grupamentos comuns aos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos denominados PAMPs. Em seguida, as partículas antigênicas são fagocitadas e associadas às moléculas de MHC II para a ativação dos linfócitos virgens nos órgãos linfóides secundários. Diferentes microrganismos estimulam diferentes

respostas imunes, mediante a liberação de citocinas, classificadas tradicionalmente em Th1, Th2 ou Th17 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Monócitos e granulócitos expressam a molécula CD14, porém a expressão deste marcador foi avaliada apenas entre as células mononucleares do sangue das bezerras. Assim, a análise das amostras no software Flowjo excluiu as células polimorfonucleares que não influenciaram nos resultados apresentados.

A expressão da molécula MHCII é mais intensa nas células apresentadoras de antígeno como os monócitos e células dendríticas, porém também podem ser expressas em linfócitos B ativados (TIZARD, 2008).

Não foram encontradas diferenças para as subpopulações de células $CD14^+MHCII^-$ e $CD14^+MHCII^+$ em relação aos grupos experimentais. Foi possível observar leve acréscimo nas proporções e valores absolutos de células $CD14^+MHCII^-$ em ambos os grupos do M0 ao M1. Este acréscimo pode ser relacionado ao aumento no número de monócitos no leucograma das bezerras apresentado pelo grupo COL^- . Reber et al. (2008b) também encontrou aumento no número de células mononucleares e $CD14^+$ após a ingestão do colostro que coincide com o segundo dia pós-parto. Este fato pode ser relacionado ao aumento do cortisol no parto, responsável pelo aumento no número de monócitos. A possibilidade da ocorrência de asfixia neonatal no COL^- , considerando os achados clínicos, também pode sinalizar para maior intensidade de resposta ao cortisol (TORNQUIST; RIGAS, 2010).

Fato intrigante é que Reber et al. (2008b) também encontrou maiores proporções de mononucleares e $CD14^+$ no COL^- . A diferença no processo de colostragem pode estar relacionada aos diferentes tempos de oferecimento do colostro entre os grupos, que foi mais tardia no COL^- , devido à necessidade do descongelamento do colostro, evento provavelmente ocorrido em ambas as pesquisas.

A inversão da relação de $CD14^+MHCII^-$ em $CD14^+MHCII^+$ maiores a partir do M4 no COL^+ e em M5 no COL^- pode ter relação com a estimulação das células diante da exposição natural aos patógenos. A resposta precoce das bezerras do grupo COL^+ pode ter relação com a presença de células maternas oriundas do colostro que poderiam direta ou indiretamente intensificar a fagocitose dos microrganismos pelas APCs das bezerras resultando em precocidade no processo de ativação.

Reber et al. (2008b) também avaliaram a expressão do MHCII nos monócitos de bezerras que receberam colostro com e sem células. Estes autores também não encontraram maior número de células expressando MHCII no COL⁻ às 48 horas de vida. A expressão do MHCII pelos monócitos também aumentou de acordo com a idade no retro-referido estudo.

A baixa expressão de células CD14⁺MHCII⁺ nas bezerras recém nascidas nas primeiras duas semanas de vida pode ter sido um fator de susceptibilidade para a ocorrência das diarreias que possui envolvimento com bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*. O CD14 é um receptor de LPS que ativa os fagócitos e resulta na síntese e secreção de mediadores inflamatórios (TNF- α) e citocinas que modulam o perfil de resposta imune Th1, Th2 ou Th17 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Piani et al. (2000) observou ainda que a baixa expressão do MHCII diminui a secreção de citocinas pró-inflamatórias, ou seja, a molécula de MHCII além de apresentar o antígeno, contribui para resposta imune antígeno-específica. As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos, como IFN-gamma, IL-6 e IL1 beta, atuam recrutando neutrófilos para a destruição do patógeno (TIZARD, 2008).

Baseado no perfil apresentado pelos monócitos sanguíneos MHCII⁺ no primeiro mês de vida, pode-se afirmar que as células tornaram-se ativas após exposição natural aos patógenos, observando-se precocidade para COL⁺. Este primeiro passo da resposta imune específica é fundamental para a ativação dos linfócitos virgens presentes nos órgão linfóides secundários.

A seleção dos linfócitos a serem marcados neste experimento foi realizada após levantamento literário. Bezerras apresentam uma proporção mínima de células B na primeira semana de vida (1-9%), observando-se aumento de 9-25% no primeiro mês de vida. Assim, as células T (CD3⁺) representam a população predominante no período neonatal, composta especialmente pela subpopulação gamma-delta (25 a 40%) (WILSON et al., 1996). Assim, esta pesquisa focou na identificação dos linfócitos T gamma-delta, devido à importância destas células para bezerras recém-nascidas.

As proporções de linfócitos gamma-delta encontrados nesta pesquisa variaram entre 34,6 a 63,8% no COL⁺ e 36,5 a 44,8% no COL⁻. A maioria das variações detectadas estava relacionada à estimulação natural aos patógenos. É

válido ressaltar que as bezerras COL⁺ apresentaram maiores valores absolutos de linfócitos T GD⁺ e GD⁻.

Os valores encontrados nesta pesquisa para o grupo COL⁺ são superiores e com relação ao COL⁻ estão contemplados no intervalo de 25 a 40% encontrados por Wilson et al. (1996), porém são maiores em ambos os grupos avaliados que os valores de 10 a 15% referenciados para animais adultos (POLLOCK; WELSH, 2002).

Linfócitos CD3⁺GD⁻, provavelmente linfócitos auxiliares (CD4⁺) e citotóxicos (CD8⁺), apresentaram variações no decorrer do estudo. O perfil apresentado para ambos os grupos foi semelhante antes dos episódios de diarreia, porém o pico de detecção dessas células ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue foi superior nas bezerras COL⁻ em M2. O aumento no número destas células nos permite afirmar que a resposta Th1 foi acionada após os episódios de infecção natural aos patógenos e que a resposta foi mais intensa no COL⁻. Apesar deste fato, pode-se verificar maiores valores relativos e absolutos para estas células em M5 no COL⁺, assim, acredita-se que o resultado final da resposta imune à exposição natural foi maior no COL⁺, o que sinaliza para o desenvolvimento de memória imunológica.

O aumento das células T gamma-delta foi precoce na COL⁻ (M2) em relação ao grupo COL⁺ (M4). Nos episódios de doenças pode-se hipotetizar que as células gamma-delta participaram da resposta imune Th1, exercendo funções celulares semelhantes aos linfócitos citotóxicos. Células T gamma-delta possuem capacidade para produzir IFN-gamma e lisar células do hospedeiro infectadas. Além disso, sabe-se que as células gamma-delta são as principais produtoras de IL-17 relacionadas à migração de neutrófilos ao foco inflamatório para destruição dos microrganismos por mecanismos enzimáticos e dependentes do oxigênio.

O aumento da subpopulação de células T gamma-delta ocorreu de forma gradativa no COL⁺ e atingiu pico máximo em M4, fato que também pode ser explicado pelo desenvolvimento da resposta imunológica no grupo de bezerras que receberam colostro com células (COL⁺).

Os maiores valores absolutos das células gamma-delta negativas e positivas apresentadas pelo COL⁻ ocorreram em concomitância com a linfocitose detectada no hemograma (M2). Este fato pode ter ocorrido pela maior intensidade da resposta inflamatória Th1 e Th17 nas bezerras COL⁻ diante dos processos infecciosos envolvidos nos quadros de diarreias, inflamações umbilicais e broncopneumonias.

Nossos achados ressaltam a importância das células T gamma-delta na resposta imune aos patógenos bacterianos envolvidos nas doenças do período neonatal. Pollock e Welsh (2002) ressaltaram que elevadas proporções de células T gamma-delta no sangue das bezerras podem sugerir seu envolvimento na intensificação da resposta Th1 das bezerras pela produção de IFN-gamma.

A pesquisa pelas células de memória foi feita dentre a população de linfócitos, selecionados pelo seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Infelizmente estas análises foram realizadas apenas nos momentos M0 e M1 o que prejudicou a análise das células de memória após os processos infecciosos.

O CD45⁺ é uma abundante proteína transmembrana tirosina fosfatase, que pode ser encontrada em variadas proporções em todos os tipos leucocitários (PELAN-MATTOCKS; PESCH; KEHRLI, 2001). Moléculas da família CD45 estão relacionadas à transdução de sinal emitido pelo receptor de células T CD3⁺. Assim, esta molécula somente será expressa nas células que passaram pelo processo de reconhecimento específico do antígeno, processo associado à memória imunológica (BEMBRIDGE et al., 1995).

As células mononucleares do sangue dos bovinos expressam CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ e em menores proporções CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺. Perfil semelhante ao observado nos humanos (AKBAR et al., 1988). Este fato nos faz sugerir que o CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ possa estar ativando um outro tipo de resposta que não a Th1.

Linfócitos T gamma-delta WC1⁺ geralmente expressam o receptor CD45RO⁺. A diminuição das células gamma-delta de acordo com a idade sugere que fatores maternos podem estimular temporariamente a expansão clonal e ativação dessas subpopulações de linfócitos (BEMBRIDGE et al., 1995).

Não foi possível detectar diferenças na expressão dos marcadores CD45 e CD45RO entre os grupos COL⁺ e COL⁻, porém observou-se aumento das células duplo positivas expressando CD45⁺CD45RO⁺ antes (M0) e após (M1) a ingestão do colostro. Em contrapartida, os linfócitos não ativados CD45⁺CD45RO⁻ diminuíram entre M0 e M1. O aumento na proporção e número de células ativadas em ambos os grupos, incluindo o COL⁻, nos permite hipotetizar que talvez outro fator imunológico do colostro, além dos leucócitos, possui a função de ativar os linfócitos do sangue das bezerras.

O congelamento do colostro induz a lise e morte das células. As células apresentaram 100% de inviabilidade após o congelamento das amostras por duas semanas. Entretanto, foi observada a preservação da morfologia celular ao microscópio óptico após o processo de congelamento (NOVO et al., 2014). Assim, componentes celulares ou mesmo citocinas do colostro poderiam ter colaborado com a ativação dos linfócitos sanguíneos.

5.5 ATIVIDADE FUNCIONAL DAS CÉLULAS MONONUCLEARES SANGUÍNEAS PARA ANTÍGENOS BACTERIANOS E BoHV-1

Esta pesquisa avaliou a participação dos leucócitos do colostro nos mecanismos da imunidade adaptativa de bezerras recém-nascidas para os patógenos BoHV-1, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A frequente exposição materna a estes antígenos norteou a seleção dos mesmos, pois seria necessário o contato materno para que as vacas pudessem transferir componentes da resposta imune específica aos seus conceitos. As bactérias selecionadas são causadoras de mastite clínica e o vírus BoHV-1 está envolvido na Doença Respiratória Bovina e enfermidades reprodutivas.

Pesquisas em humanos ressaltam que as células maternas podem atuar na maturação da resposta imune pela veiculação de partículas bacterianas e/ou transferirem memória imunológica aos recém-nascidos (PÉREZ et al., 2007).

Staphylococcus spp, *Streptococcus* spp e Enterobacteriaceae são os principais aeróbios isolados no leite materno e fezes de recém-nascidos humanos, além dos anaeróbios *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp (MARTIN et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013). Testes de biologia molecular confirmaram que mãe e recém-nascido compartilham as mesmas cepas bacterianas, indicando que o leite materno pode contribuir para a transferência de bactérias e colaborar com a colonização do intestino infantil (MARTIN et al., 2012). Na Medicina Veterinária, a separação da vaca e bezerra imediatamente após o nascimento pode propiciar a colonização da microbiota intestinal por bactérias ambientais (REIS et al., 2014).

Em humanos, a transferência de bactérias do intestino materno para a secreção mamária ocorre pela via entero-mamária presente no final da gestação, no

qual as células dendríticas maternas migram da circulação para a captura de antígenos no lúmen intestinal. Acredita-se que as células maternas atuam na apresentação de antígenos (PAMPS) aos linfócitos *nãive* presentes nos órgãos linfóides secundários dos recém-nascidos após a ingestão do leite materno (MARTIN et al., 2004; PÉREZ et al., 2007). A elevada proporção de macrófagos no colostro bovino pode sinalizar para mecanismos similares em ruminantes.

Os diferentes perfis apresentados pelas células mononucleares do sangue das bezerras COL⁻ e COL⁺, diante dos diferentes antígenos bacterianos e BoHV-1, pode colaborar no entendimento parcial do envolvimento das células maternas com o desenvolvimento da imunidade específica dos neonatos bovinos.

A avaliação precoce da influência das células maternas foi limitada ao insuficiente número de células viáveis obtidas a partir de 60mL de sangue das bezerras, sendo possível a realização dos ensaios apenas a partir do M2. Além disso, a concentração celular obtida a partir deste momento possibilitou a realização dos ensaios em quadruplicatas, assim o número de citocinas avaliadas ficou limitado à quantidade de sobrenadante do cultivo celular, sendo selecionadas apenas as citocinas IFN-gamma e IL-17.

A citocina IFN-gamma é produzida por linfócitos T e células NK. Esta é a principal citocina ativadora de macrófagos, promovendo o aumento da atividade microbicida dessas células pelo incremento da sua capacidade em produzir os radicais livres peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. IFN-gamma também ativa neutrófilos e estimula atividade citolítica das células NK. Em relação à imunidade adaptativa, esta citocina promove diferenciação das células Th0 em Th1 aumentando a resposta imune adaptativa mediada por células (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A produção da citocina IFN-gamma apresentou perfil diferenciado entre os grupos, apesar da dificuldade de detectar diferenças estatísticas devido à distribuição não paramétrica dos dados. Bezerras COL⁺ apresentaram maior resposta à ConA, substância utilizada para estimular a expansão clonal das subpopulações de linfócitos T, especialmente CD8⁺ (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996) e gamma-delta (ROAK et al., 2008), que resultou em maior produção dessa citocina em M3 e M5. Bezerras COL⁻ não responderam a ConA, indicando baixa taxa de expansão clonal dos linfócitos no ambiente do cultivo celular.

Em relação aos patógenos bacterianos, as bezerras COL⁺ responderam precocemente à *Escherichia coli* (M3) em relação ao pico apresentado pelo COL⁻ (M4). Estes patógenos estão comumente associados à colonização da microbiota intestinal das bezerras, além disso, algumas cepas possuem potencial para promover quadros de diarreia. A resposta precoce aos quadros de diarreia apresentada pelo COL⁺ pode estar associada à importância das células maternas apresentadoras de antígenos na apresentação desses associados ao MHCII aos linfócitos T produtores da citocina IFN-gamma (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

No momento M5 observou-se um pico de produção da citocina IFN-gamma pelas bezerras COL⁺ em contraste aos baixos valores encontrados para a COL⁻. Este fato que pode ter ocorrido pela maturação imune aos patógenos causadores da diarreia no COL⁺. Assim, a resposta imune Th1 pode ter sido mais desenvolvida nas bezerras COL⁺ mediante o reconhecimento das bactérias Gram-negativas pelas APCs mediadas pelos receptores Toll-like 4. APCs estimulam a ativação e expansão clonal das células Th1 e células efetoras T citotóxicas produtoras de IFN-gamma (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Riedel-Caspari e Schmidt (1991a) avaliaram bezerros que receberam colostro com células, sem leucócitos, sucedâneo lácteo suplementado com células do colostro e sucedâneo lácteo sem células. Estes autores observaram maior resposta blastogênica em células estimuladas com ConA no grupo que recebeu colostro com células, coincidindo com os dados apresentados nesta pesquisa. Riedel-Caspari e Schmidt (1991b) observaram também maior produção de anticorpos específicos para *E. coli* no grupo COL⁻.

Reber; Hippen e Hurley (2005) detectaram maior proliferação das células estimuladas com *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) no COL⁺, nas primeiras 3 semanas de vida. Este fato corrobora com a maior produção de citocinas no grupo COL⁺ nesta pesquisa.

Células mononucleares das bezerras COL⁻ apresentaram maior produção de IFN-gamma quando estimuladas com *Staphylococcus aureus* (1:10 e 1:50), especialmente no M4 onde ocorreram os casos de diarreia. Diferentes respostas às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas entre os grupos são intrigantes e talvez as alterações da microbiota intestinal das bezerras nos quadros de diarreias foram mais importantes para a estimulação da resposta imune pontual que àquelas

transferidas pelas mães. Além disso, *Staphylococcus aureus* estão envolvidos na etiopatogenia das inflamações umbilicais apresentadas apenas pelas bezerras COL⁻.

A citocina IL-17 é produzida principalmente pelas células T gamma-delta, além das células auxiliares (CD4⁺) e NK. A resposta Th17 é responsável pelo recrutamento de neutrófilos aos tecidos periféricos diante de processos inflamatórios (ROARK et al., 2008).

As células provenientes do grupo COL⁻ não responderam para a produção de citocina IL-17 quando estimuladas com ConA e *Staphylococcus aureus* 1:50. A resposta das células no COL⁺ para a *Escherichia coli* foi mais intensa que aquela apresentada pelo COL⁻. Os picos de produção destas citocinas foram coincidentes em M3 e M5, respectivamente, antes e após os episódios de infecção natural.

Bezerras recém-nascidas apresentam a particularidade de elevadas proporções de células T gamma-delta WC1⁺ (25-40%) em relação a 17% nos adultos (WILSON et al., 1996). Estas células representam a principal fonte da citocina IL-17 (ROARK et al., 2008).

Existem indícios do aumento do número das células T gamma-delta após a ingestão do colostro em suínos (BANDRICK et al., 2014), acreditando-se que a transferência de fatores imunes do colostro, como células e citocinas, pode estar relacionado a ativação e rápida expansão clonal dessas células. Esta pesquisa não encontrou aumento na proporção de células T gamma-delta no sangue das bezerras após a ingestão do colostro materno, porém a participação das células na reposta imune das bezerras pode ser sutil que impossibilitam detecções quando as mensurações forem realizadas no sangue sem estímulo direto aos antígenos.

Hurley et al. (2015) avaliaram a resposta imune específica em bezerros de corte, de 2 a 4 dias de vida, que haviam recebido colostro fresco por meio de amamentação natural. Estes autores verificaram maior proporção de células gamma-delta WC1⁺ apresentando o marcador de ativação CD25⁺, quando as células mononucleares foram estimuladas com a enterotoxina estafilocócica (SEB). Assim as diferentes respostas obtidas para os grupos COL⁺ e COL⁻ pode estar relacionada ao aumento da atividade funcional das células gamma-delta após o recebimento do colostro fresco. Apesar do conhecimento da maior proporção das células T gamma-delta no sangue das bezerras em relação ao CD4 e CD8, a confirmação da participação dessas células em relação à produção das citocinas somente poderia ser estabelecida com a imunofenotipagem das células do cultivo celular.

A análise conjunta dos dados obtidos no leucograma, imunofenotipagem e resposta específica aos estímulos bacterianos *in vitro* mostraram que as bezerras COL⁻ apresentaram menor número absoluto de neutrófilos circulantes no M2, apesar do maior número de linfócitos, especialmente T gamma-delta e CD3⁺gamma-delta⁻. Em contrapartida, as bezerras COL⁺ apresentaram maior número de neutrófilos circulantes no M2, fato que talvez possa ser associado a maior eficiência das células T gamma-delta das bezerras COL⁺ na produção precoce de IL-17 e recrutamento de neutrófilos. Este fato pôde ser confirmado pela maior produção de IL-17 quando as células mononucleares sanguíneas do COL⁺ foram estimuladas em M3.

Shibata et al. (2007) analisaram a produção de IL-17 por células T gamma-delta em ratos infectados por *Escherichia coli*, e a depleção de genes para essa citocina resultou na diminuição da concentração de IL-17 e infiltração de neutrófilos na cavidade peritoneal. Este fato corrobora para a hipótese de que as células T gamma-delta desempenham importante papel na resposta aos agentes bacterianos.

A resposta do M5 pode ser compatível com memória imunológica após infecção natural aos patógenos, observando-se maior resposta das células mononucleares sanguíneas das bezerras COL⁺, quando estimuladas com ConA, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Os diferentes picos observados para a produção do IFN-gamma (M4) e IL-17 (M3) pode indicar diferentes fontes para a produção dessas citocinas. Ou seja, linfócitos T gamma-delta seriam mais hábeis para produzir IL-17 e células T auxiliares e citotóxicas fundamentais para a produção do IFN-gamma.

As células não estimuladas e estimuladas com BoHV-1 não produziram nenhuma das duas citocinas analisadas em todo período experimental.

A interação do sistema imune da mãe e do feto durante a gestação resulta na produção das citocinas do tipo Th1, como a IFN-gamma que é deletéria para a implantação e desenvolvimento fetal. Para a manutenção desta ocorre modulação da resposta imune materna e fetal para o tipo Th2. Estas citocinas do tipo Th2 são benéficas além de suprimirem a Th1 (WEGMANN et al., 1993; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Neste contexto, neonatos apresentarão predomínio da resposta imune humoral e supressão da resposta imune celular (Th1) ao nascimento (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). A diminuição da resposta imune Th1 dos recém-nascidos pode corroborar com a fraca resposta das células mononucleares ao BoHV-1.

Outro fator seria o do BoHV-1 estar inativado, que confere na incapacidade desse se replicar nas células das bezerras e desencadear resposta celular mediada por linfócitos T citotóxicos- CD8 (PLATT et. al., 2008). A fraca resposta ao estímulo viral pode também justificar a susceptibilidade das bezerras na Doença Respiratória Bovina.

Donovan et al. (2007) também avaliou a resposta imune específica para bactérias (*Mycobacterium bovis*) e vírus (Vírus da Diarreia Viral Bovina) em bezerros alimentados com colostro fresco e acelular. O grupo COL⁺ apresentou maior resposta proliferativa para células estimuladas com bactérias no sétimo dia de vida, provavelmente maior liberação de citocinas fato equivalente ao M3 desta pesquisa para *E. coli* 1:50. Além disso, observou menor resposta ao BVDV em relação ao estímulo bacteriano.

De modo geral, foi observada uma resposta precoce com relação à produção de IFN-gamma e valores superiores para a IL-17 no grupo de bezerras que recebeu colostro com células (COL⁺).

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos pode-se concluir:

- a) bezerras COL⁻ apresentaram maior frequência e intensidade de doenças que evoluíram para anemia da inflamação;
- b) bezerras COL⁻ apresentaram maior número absoluto de linfócitos, representadas especialmente pela subpopulação CD3⁺gamma-delta⁺ nos episódios de maior frequência de diarreias;
- c) linfócitos de memória CD45RO⁺ aumentaram após a colostragem em ambos os grupos, sugerindo que outros componentes acelulares do colostro podem apresentar papel fundamental no desenvolvimento da resposta imunológica de bezerras recém-nascidas;
- d) a subpopulação CD3⁺gamma-delta⁻ e as células CD14⁺MHCII⁻ e CD14⁺MHCII⁺ aumentaram durante o primeiro mês de vida, indicando maturação imunológica;
- e) as células mononucleares das bezerras não responderam ao Herpesvírus Bovino tipo 1, porém responderam aos estímulos bacterianos, especialmente para a *Escherichia coli*; a interpretação do leucograma em conjunto com a análise das variações apresentadas para as citocinas inflamatórias IFN-gamma e IL-17 permitem afirmar que bezerras COL⁻ apresentaram resposta inflamatória retardada e de menor magnitude que COL⁺.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787-793, 1996.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.

AKBAR, A. N.; TERRY, L.; TIMMS, A.; BEVERLEY, P. C. L.; JANOSSY, G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. **The Journal of Immunology**, v. 140, p. 2171-8, 1988.

ALDRIDGE, B. M.; MCGUIRK, S. M.; LUNN, D. P. Effect of colostral ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 51-64, 1998.

ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L. E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, P. M. H.; ENEMARK, J. M. D. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p.165-171, 2009.

BANDRICK, M.; ARIZA-NIETO, C.; BAIDOO, S. K.; MOLITOR, T. W. Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 43, n. 1, p. 114-120, 2014.

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.

BARTELS, C. J. M.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A. J. M.; LAM, T. J. G. M. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens innormal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 162–169, 2010.

BEMBRIDGE, G. P.; MACHUGH, N. D.; MCKEEVER, D.; AWINO, E.; SOPP, P.; COLLINS, R. A.; GELDER, K. I.; HOWARD, C. J. CD45RO expression on bovine T cells: relation to biological function. **Immunology**, v. 86, n. 4, p. 537-44, 1995.

BENESI, F. J.; KOGIKA, M. M. **Fluidoterapia**. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

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

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

BIBURGER, M.; LUX, A.; NIMMERJAHN, F. How immunoglobulin g antibodies kill target cells: revisiting an old paradigm. **Advances in Immunology**, v. 124, p. 67-94, 2014.

BORN E. **Untersuchungen über den Einfluss der Schnittentbindung auf die Vitalität neugeborener Kälber**. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1981.

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

BRUN-HANSEN, H. C.; KAMPEN, A. H.; LUND, A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 2, p. 182-187, 2006.

CAMPANA, D.; JANOSSY, G.; COUSTAN-SMITH, E.; AMLOT, P. L.; TIAN, W. T.; IP, S.; WONG, L. The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man. **The Journal of Immunology**, v. 42, p. 57-66, 1989.

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

CHIGERWE, M.; TYLER, J. W.; MIDDLETON, J. R.; SPAIN, J. N.; DILL, J. S.; STEEVENS, B. J. Comparison of four methods to assess colostral IgG concentration in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, p. 761-766, 2008.

CORTESE, V. S. Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 25, p. 221-227, 2009.

CROSS, M. L.; GILL, H. S. Immunomodulatory properties of milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. S81-S89, 2000. Supplement, 1.

DAVEY, M. G.; JOHNS, D. P.; HARDING, R. Postnatal development of respiratory function in lambs studied serially between birth and 8 weeks. **Respiration Physiology**, v. 113, p. 83-93, 1998.

DARVEAU, R. P. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 36-42, 1998.

DAVIS, M. M.; BJORKMAN, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature**, v. 334, p. 395-402, 1988.

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

DONOVAN, D. C.; REBER, A. J.; GABBARD, J. D.; ACEVES-AVILA, M.; GALLAND, K. L.; HOLBERT, K. A.; ELY, L. O.; HURLEY, D. J. Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 7, p. 778-82, 2007.

ELFSTRAND, L.; MANSSON, H. L.; PAULSSON M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing. **International Dairy Journal**, n. 12, p. 879-887, 2002.

FERNANDÉZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J. M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, p. 1-10, 2013.

GIRARDI, M. Immunosurveillance and Immunoregulation by $\gamma\delta$ T Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 25-31, 2006.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v. 24, p. 19- 39, 2008.

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

GOMES, V.; BACCILI, C. C.; SILVA, C.P. C.; GOMES, C. O. M. S. Development of specific immune system and detection of risk factors for diseases in Holstein calves. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 28., 2014, Cairns, Austrália. **Anais...** Cairns, Austrália, 2014.

GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ALVES, M.; BAPTISTELLA, F.; BENESI, F. J. Dinâmica da celularidade do colostro de vacas holandesas no pós-parto imediato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p.1047-1053, 2011.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M. M.; KUSZAK, J.; SCOTT MCVEY, D. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v. 26, p. 381-394, 2010.

GULLIKSEN, S. M.; JOR, E.; LIE, K. I.; HAMNES, I. S.; LOKEN, T.; ÅKERSTEDT, J.; OSTERÅS, O. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5057–5066, 2009.

HAKS, M. C.; LEFEBVRE, J. M.; LAURITSEN, J. P. H.; CARLETON, M.; RHODES, M.; MIYAZAKI, T.; KAPPES, D. J.; WIEST, D. L. Attenuation of gammadelta TCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. **Immunity**, v. 22, p. 595–606, 2005.

HAYES, S. M.; LI, L.; LOVE, P. E. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. **Immunity**, v. 22, p. 583–593, 2005.

HURLEY, D. J.; BERGHAUS, L. J.; HURLEY, K. A. E.; PENCE, M. E.; BERGHAUS, R. D.; WOOLUMS, A. R. An Immunological Profile of 79 Beef Calves at 1 to 4 Days of Age. In: KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY - IMMUNITY TO VETERINARY PATHOGENS: INFORMING VACCINE DEVELOPMENT, 2015, Keystone, Colorado USA. **Anais...** Keystone, Colorado USA, 2015.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; LEE, J-W.; IBEAGHA, A. E.; ZHAO, X. Bovine CD14 gene characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclear neutrophils. **BMC Genetics**, v. 9, p. 50, 2008.

KAMPEN, A. H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T.; STORSET, A. K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 53–63, 2006.

KNOWLES, T. G.; EDWARDS, J. E.; BAZELEY, K. J.; BROWN, S. N.; BUTTERWORTH, A.; WARISS, P. D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, v.147, p. 593–598, 2000.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, p. 467-476, 2004 .

KIKU, Y.; OZAWA, T.; KUSHIBIKI, S.; SUDO, M.; KITAZAKI, K.; ABE, N.; TAKAHASHI, H.; HAYASHI, T. Decrease in bovine CD14 positive cells in colostrum is associated with the incidence of mastitis after calving. **Veterinary research communications**, v. 34, n. 2, p. 197-203, 2010.

KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 75-80, 2000.

KRUSE, P. E. The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. **Annales de Recherches vétérinaires**, v. 14, n. 4, p. 349-353, 1983.

LA MOTTE, G. B.; EBERHART, R. J. Blood leukocytes, neutrophil phagocytosis, and plasma corticosteroids in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1189-1193, 1976.

LANGEL, S. N.; WARK, W. A.; GARST, S. N.; JAMES, R. E.; MCGILLIARD, M. L.; PETERSSON-WOLFE, C. S.; KANEVSKY-MULLARKY, I. Effect of feeding whole compared with cell-free colostrum on calf immune status: The neonatal period. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3729-3740, 2015.

LEE, G. R.; KIM, S. T.; SPILIANAKIS, C. G.; FIELDS, P. E.; FLAVELL, R. A. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. **Immunity**, v. 24, n. 4, p. 369-379, 2006.

LEONEL, R. A. B.; MATSUNO, R. M. J.; VERONEZI, A. H. M.; PEREIRA, D. M. Neonatologia de grandes animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1-8, 2009.

LEWIS, D. B.; YU, C. C.; MEYER, J.; ENGLISH, B. K.; KAHN, S. J.; WILSON, C. B. Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin-4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 194-202, 1991.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIEDEL-GASPARI, G.; POHLENZ, J. F. Uptake of colostral leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, n.1-2, p. 33-40, 2002.

LIN, L.; IBRAHIM, A. S.; XU, X.; FARBER, J. M.; AVANESIAN, V.; BAQUIR, B.; FU, Y.; FRENCH, S. W.; EDWARDS JR., J. E.; SPELLBERG, B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 12, p. 1-12, 2009.

LINKE, B.; BOSTEDT, H.; RICHTER, A. Computer Tomographic Illustration of the Development of the Pulmonary Function in Bovine Neonates until the Twenty-First Day Postnatum. **Veterinary Medicine International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MARTIN, V.; BARRAGÁN, A. M.; MOLES, L.; BANOS, M. R.; CAMPO, R.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J. M.; JIMENEZ, E. Sharing of bacterial strains between breast milk and infants feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 1, 36-44, 2012.

MCGUIRK, S. M. Disease management of dairy calves and heifers. **Veterinary Clinics of North America**, food animal practice, v. 24, n.1, p. 139-156, 2008.

MCGUIRK, S. M.; COLLINS, M. Managing the production, storage, and delivery of colostro. **Veterinary Clinics North America**, v. 20, p. 593-603, 2004.

MEE, J. F. Managing the calf at calving time. **Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners**, v. 41, p. 46-53, 2008.

MEGANCK, V.; GODDEERIS, B. M.; STUYVEN, E.; PIEPERS, S.; COX, E.; OPSOMER, G. Development of a method for isolating bovine colostrum mononuclear leukocytes for phenotyping and functional studies. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 294-298, 2014.

MOHRI, M.; SARRAFZADEH, F.; SELFI, H. A.; FARZANEH, N. Effects of oral iron supplementation on some haematological parameters and iron biochemistry in neonatal dairy calves. **Comparative Clinical Pathology**, v. 13, p. 39-42, 2004.

MOHRI, M.; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 30-39, 2007.

MÖLNE, L.; CORTHAY, A.; HOLMDAHL, R.; TARKOWSKI, A. Role of gamma/delta T cell receptor-expressing lymphocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 132, p. 209–215, 2003.

MORRILL, K. M.; QUIGLEY, J. D.; LAGO, A.; TYLER, H. D. Estimate of colostrum IgG concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3987–3996, 2012.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Imunidade inata. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAGAHATA, H.; HIGUCHI, H.; YAMASHIKI, N.; YAMAGUCHI, M. Analysis of the functional characteristics of L-selectin and its expression on normal and CD18-deficient bovine neutrophils. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 3, p. 264-271, 2000.

NOVO, S. M. F.; REIS, J. F.; SOBREIRA, N. M.; GOMES, V. Effect of temperature and conservation time on the feasibility of bovine colostrum cells. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 28., 2014, Cairns, Austrália. **Anais...** Cairns, Austrália, 2014.

OKAMOTO YOSHIDA, Y.; UMEMURA, U.; YAHAGI, A.; O'BRIEN, R. L.; IKUTA, K.; KISHIHARA, K.; HARA, H.; NAKAE, S.; IWAKURA, Y.; MATSUZAKI, G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 4414–4422, 2010.

O'KEEFFE, M. A.; METCALFE, S. A.; CUNNINGHAM, C. P.; WALKER, I. D. Sheep CD4(+) alphabeta T cells express novel members of the T19 multigene family. **Immunogenetics**, v. 49, p. 45–55, 1999.

OHTSUKA, H.; TERASAWA, S.; WATANABE, C.; KOHIRUIMAKI, M.; MUKAI, M.; ANDO, T.; PETROVSKI, K. R.; MORRIS, S. Effect of parity on lymphocytes in

peripheral blood and colostrum of healthy Holstein dairy cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 130-135, 2010.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 285-297, 1997.

PELAN-MATTOCKS, L. S.; PESCH, B. A., KEHRLI, M. E. Flow cytometric analysis of intracellular complexity and CD45 expression for use in rapid differentiation of leukocytes in bovine blood samples. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1740–1744, 2001.

PEREZ, P. F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J.; SERRANT, P. ROGGERO, I. S.; SCHIFFRIN, E. J.; HUGHES, A. D. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v.119, n. 3, p. e724-e732, 2007.

PIANI, A.; HOSSLE, J. P.; BIRCHLER, T.; SIEGRIST, C. A.; HEUMANN, D.; DAVIES, G.; LOELIGER, S.; SEGER, R.; LAUENER, R. P. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. **European journal of immunology**, v. 30, n. 11, p. 3140-3146, 2000.

PICCIONE, G.; BORRUSO, M.; FAZIO, F.; GIANNETTO, C.; CAOLA, G. Physiological parameters in lambs during the first 30 days postpartum. **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 57-60, 2007.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; PENNISI, P.; GIANNETTO, C.; COSTA, A.; CAOLA, G. Monitoring of physiological and blood parameters during perinatal and neonatal period in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1-12, 2010.

PLATT, R.; WIDEL, P. W.; KESL, L. D.; ROTH, J. A. Comparasion of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. **Vaccine**, v. 27, p. 4508-4519, 2009.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D. The WC1p gd T-cell population in cattle—a possible role in resistance to intracellular infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, p. 105–114, 2002.

POULSEN, K. P.; MCGUIRK, S. M. Respirator y diseaseof the bovine neonate. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 25, p. 121–137, 2009.

QUIGLEY, J. D.; LAGO, A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1148–1155, 2013.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostrum leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 305-313, 2008a.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostrum leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part I. Effects on monocyte lineage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 186–196, 2008b.

REBER, A. J.; HIPPEN, A. R.; HURLEY, D. J. Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 1854–1860, 2005.

REBER, A. J.; LOCKWOOD, A.; HIPPEN, A. R.; HURLEY, D. J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 1-2, p. 139-50, 2006.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, p. 493-494, 1938.

RENGIFO, S. A.; SILVA, R. A.; BOTTEON, R. C. C.; BOTTEON, P. T. Hemograma e bioquímica sérica auxiliar em bezerros mestiços neonatos e ocorrência de enfermidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 993-997, 2010.

REIS, J. F.; NOVO, S. M. F.; BACCILI, C. C.; STRICAGNOLO, C. R.; SILVA, B. T.; GOMES, V. Transfer of heifers calves from maternity to calf pen: The impact on the population of enterobacteria. In: SYMPOSIUM ON GUT HEALTH IN PRODUCTION OF FOOD ANIMALS, 2014, St. Louis, MO. **Anais...** St. Louis, MO, 2014

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

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

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

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.

RODRIGUES, J. A. **Assistência clínica materna e neonatal à diferentes condições obstétricas em bovinos da raça Holandesa**, 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SHIBATA, K.; YAMADA, H.; HARA, H.; KISHIHARA, K.; YOSHIKAI, Y. Resident Vdelta1⁺ gamma-delta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 4466-4472, 2007.

SILVA, C. P. C. **Imunidade inata no sangue e secreção mamária de vacas Holandesas no período periparto**. São Paulo, 2014. 142 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SILVA, B. T.; NOVO, S. M. F.; REIS, J. F.; HEINKLEIN, A.; BACCILI, C. C.; GOMES, V. Longitudinal analysis of vital parameters of healthy Holstein calves from birth to weaning. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 28., 2014, Cairns, Austrália. **Anais...**Cairns, Austrália, 2014.

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

TORNQUIST, S. J.; RIGAS, J. Interpretation of ruminant leukocyte. In: SCHALM, O. W. **Veterinary hematology**. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, 2010. p. 307-312.

VARGA, J.; MESTER, L.; BÖRZSÖNYI, L.; ERDÉSZ, C.; VÁRI, A.; KÖRMÖCZI, P. S.; SZENCI, O. Adaptation of respiration to extrauterine-life in healthy newborn calves. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 377–379, 1999.

VOGEL, G.; NICOLET, J.; MARTIG, J.; TSCHUDI, P.; MEYLAN, M. Pneumonia in calves: characterization of the bacterial spectrum and the resistance patterns to antimicrobial drugs. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 143, n. 7, p. 341-50, 2001.

WANG, F.; HERZIG, C.; OZER, D.; BALDWIN, C. L.; TELFER, J. C. Tyrosine phosphorylation of scavenger receptor cysteine-rich WC1 is required for the WC1-mediated potentiation of TCR-induced T-cell proliferation. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 254–266, 2009.

WATSON, D. L. Immunological functions of the mammary gland and its secretion-comparative review. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 403-422, 1980.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T.2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.

WILLIAMS, P. P. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs, **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p.1-8, 1993.

WILSON, C. B. The ontogeny of T lymphocyte maturation and function. **The Journal of Pediatrics**, v. 118, n. 3, p. S4-S9, 1991.

WILSON, R. A.; ZOLNAI, A.; RUDAS, P.; FRENYO, L. V. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 53, n. 1-2, p. 49-60, 1996.

YE, P.; GARVEY, P. B.; ZHANG, P.; NELSON, S.; BAGBY, G.; SUMMER, W. R.; SCHWARZENBERGER, P.; SHELLITO, J. E.; KOLLS, J. K. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, p. 335–340, 2001.

ANEXO A - PBS 10X (Concentrado)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	26,79g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,14g
NaCl	82g
Água destilada.....	1000mL
PBS uso 1 PBS 10X: 9 de água destilada	

ANEXO B - Preparo da solução 100mM EDTA

EDTA sal dissódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)- peso molecular de 372,24.....3,722g

Água destilida.....100mL

Homogeneizar até dissolver completamente o sal e colocar autoclave

ANEXO C - Meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*)

Meio BHI desidratado.....37g

Água destilada.....1000mL

Distribuir o líquido em frascos de 15 mL e esterilizar

ANEXO D - PBS de bactérias

NaCl.....	8g
Fosfato monobásico de potássio.....	0,2g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	2,8g
KCl.....	0,2g
Água destilada q.s.p.	1000mL
Acertar o pH 7,4	
Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis	

ANEXO E - RPMI suplementado p/ 500mL

L. glutamina (2mM).....	0,146g
Soro Fetal Bovino (10%).....	50mL
Penicilina (60µg/mL).....	3mL
HEPES.....	4,86mL
RPMI ¹⁴	500mL
Suplementar o RPMI em capela de fluxo para evitar contaminação	

¹⁴ RPMI 1640, Sigma®

ANEXO F - Preparo da solução NaCl 0,2% e 1,6%

0,2%

Água destilada.....500mL

NaCl (Cloreto de Sódio).....1g

1,6%

Água destilada.....500mL

NaCl (Cloreto de Sódio).....8g

Homogeneizar até dissolver completamente o sal e colocar autoclave

ANEXO G - Azul de Trypan (0,4%)

Azul de Trypan.....2g

PBS.....50mL

Solução de uso

1mL da solução estoque para 4mL de PBS - acondicionar geladeira e proteger da luz solar.

ANEXO H - Solução de *Concanavalina A* para 5mL

500µg *Concanavalina A*.....0,0005g
PBS estéril.....5mL
Homogeneizar e alicotar em capela de fluxo