JULIANA FRANÇA DOS REIS COSTA

**Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da
microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias
em bezerras recém-nascidas**

São Paulo

2016

JULIANA FRANÇA DOS REIS COSTA

**Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da
microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de
diarreias em bezerras recém-nascidas**

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Profa. Dra. Viviani Gomes

São Paulo

2016

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.3332
FMVZ

Costa, Juliana França dos Reis
Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal,
resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas / Juliana
França dos Reis Costa. -- 2016.
156 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Viviani Gomes.

1. Colostro congelado. 2. Colostro fresco. 3. Contagem bacteriana. 4. Neutrófilos.
5. Fagocitose. I. Título.

São Paulo, 05 de maio de 2016

CEUA N [2669070714](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Viviani Gomes

Área: Clínica Médica Veterinária

Viviani Gomes (orientador)

Título do projeto: "INFLUÊNCIA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO NO DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM BEZERRAS HOLANDESAS RECÉM-NASCIDAS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 04/maio/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "À Comissão de Ética, Venho, inicialmente agradecer pelo pronto atendimento da solicitação inicial de alteração de título do do projeto de mestrado da minha orientada Juliana França dos Reis, inscrito na comissão: CEUA Nº 2669070714. Gostaria também de pedir, novamente, a alteração para o título inicial pois, após melhor aproveitamento dos dados, vimos nesta reta final que a melhor opção ficaria o título inicial, onde inclui a parte das diarreias já no título. Dessa forma, gostaria de alterar o atual título: "INFLUÊNCIA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO NO DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM BEZERRAS HOLANDESAS RECÉM-NASCIDAS" para o título inicial: "INFLUÊNCIA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO NO DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL, RESPOSTA IMUNE INATA E INCIDÊNCIA DE DIARREIAS EM BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS" Por gentileza, gostaria que se possível essa alteração fosse feita o quanto antes uma vez que minha orientada precisa dar entrada na biblioteca até dia 12/05 e a alteração é apenas para melhor aproveitamento do conteúdo da dissertação e resultados obtidos. Muito obrigada pela atenção, Profa. Viviani Gomes. "

Comentário da CEUA: "aprovado".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: COSTA, Juliana França dos Reis

Título: **Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas**

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 que sempre guiou meus passos, permitindo-me ter saúde e força para enfrentar todos os obstáculos impostos pela vida e também por me cobrir de bênçãos e alegrias.

À minha mãe Sylvia que nunca mediu esforços para me ajudar em todos os momentos da minha vida; ao meu pai Esio, que de onde estiver sei que sente imenso orgulho de mim; ao meu irmão Bruno, que desempenhou papel importante ao me guiar nos primeiros estudos, me ensinando muito.

Ao meu marido Thiago, pelo amor, carinho e companheirismo que me inspira e motiva diariamente. Juntos, iremos sempre mais longe.

À minha orientadora Profa. Dra. Viviani Gomes, por toda determinação e excelência com que desempenha seu trabalho diariamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha saúde... pela incrível força, paz e serenidade que me fez seguir adiante nos momentos de dificuldade e por ser tão bom e generoso ao proporcionar inúmeras realizações e alegrias em minha vida.

À minha mãe, Sylvia de França Guimarães, companheira e melhor amiga de uma vida inteira. Obrigada por todas as ajudas, pelos nossos momentos “mãe e filha”, por me orientar, aconselhar, me salvar sempre que precisei de última hora, jamais medindo esforços para isso. Muito obrigada por sacrificar a sua vida, pela minha. Serei eternamente grata e espero conseguir ser uma mãe tão boa para meus filhos!

Ao meu pai, Esio dos Reis Filho, que me deixou em meio à correria do experimento, em que tivemos a oportunidade de nos vermos pela última vez num domingo, dentro do laboratório da FMVZ, na sala do fluxo já que infelizmente estava muito difícil conciliar tempo para ir visitá-lo. Me desculpe pelos momentos de ausência! Sei do tanto que valorizava o estudo e principalmente a USP. Sei que você foi embora orgulhoso do que viu por mais que, apesar de médico, tenha achado “complexo demais” acompanhar todo este avanço. Obrigada por ter exigido tanto de mim durante a vida inteira. Inúmeras vezes eu achei essa cobrança excessiva; mas, sem isso, talvez eu não tivesse chegado até aqui. Obrigada! Saudades, pai!

Ao meu irmão, Bruno França dos Reis, a pessoa mais inteligente que já conheci, meu grande orgulho. Obrigada por ter dividido comigo sempre seu imenso conhecimento sobre tudo e ter me ensinado sobre tantas coisas nesta vida. Obrigada pela amizade, parceria e irmandade que nos une e unirá eternamente.

Ao meu querido marido Thiago João Costa, meu grande companheiro, amor da minha vida. Obrigada por tudo. Por sempre me incentivar a crescer, estar ao meu lado e por valorizar cada conquista. Você é um exemplo de profissional, comprometido, batalhador e merecedor de todas as suas conquistas. Obrigada por entender e aceitar sempre que precisei estar longe de casa, por ser um marido tão

dedicado à nossa família e por estarmos juntos construindo, dia após dia, cada um dos nossos sonhos. Te amo muito!

À minha orientadora, Profa. Dra. Viviani Gomes, primeiramente pela oportunidade que me proporcionou ao abrir as portas de sua equipe desde a Iniciação Científica em 2013, sem ainda me conhecer muito bem, proporcionando-me não apenas esta conquista, mas também inúmeras outras oportunidades nesta trajetória. Obrigada pela confiança depositada em mim e no meu trabalho. Você é um exemplo de persistência e a prova de que com muito empenho, força de vontade e dedicação chegaremos lá! Muito obrigada!

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

À Profa. Dra. Karina Medici Madureira pela parceria, colaboração nas análises laboratoriais e artigos, bem como pelos momentos de descontração em suas vindas à FMVZ/USP. Ao Jean Silva Ramos pela prontidão em ajudar a todos à sua volta. Obrigada!

À Rejane dos Santos Sousa pela ajuda nas análises de cortisol e por ser sempre atenciosa com a nossa equipe.

Ao Prof. Dr. David John Hurley, da "University of Georgia" por auxiliar nas ideias, técnicas e análises da proposta inicial deste trabalho, além de transmitir seus conhecimentos e sugestões sempre que solicitamos sua ajuda. Obrigada por me

receber em sua Universidade durante o pós doc da professora Viviani e me mostrar um pouco da fascinante realidade da pesquisa nos Estados Unidos.

À Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera pelo carinho comigo nesses anos, e por sempre nos mostrar que é possível buscar um equilíbrio saudável entre a vida pessoal e uma carreira de sucesso. À Profa. Dra. Carla Maria Bittar por já ter contribuído bastante com seu conhecimento à nossa equipe, e agora agradeço por terem aceito o convite para compor a banca desta dissertação.

Aos colegas de equipe: Sylvia Marquart Fontes Novo e Camila Costa Baccili além de excelentes profissionais, por terem sido maravilhosos seres humanos ao agarrarem como de vocês toda a minha parte a campo do experimento, no momento em que precisei me ausentar pelo súbito falecimento do meu pai. Agradeço do fundo do meu coração, pois vocês foram além do limite para me ajudar nesse momento tão difícil e só por isso foi possível finalizar este trabalho com a máxima qualidade. Agradeço também à nossa orientadora que mesmo estando em seu pós doc nos EUA, soube nos auxiliar e conduzir esta situação, ajudando da melhor forma a todos. Muito obrigada por, acima de tudo, terem demonstrado apoio, carinho e amizade!

Aos membros da equipe que, mesmo já tendo saído, tiveram participação importante em minha trajetória: Cynthia Pereira da Costa e Silva, Vinicius Alvim Passos Baldacim pelos saudosos momentos do IC e Bruno Toledo Silva, muito obrigada! Aos mais novos: Camila Cecília Martin obrigada pelo apoio, convívio alegre e diário e Natalia Meirelles Sobreira pela ajuda com os animais na fazenda. Boa sorte nesta fase que se inicia! A todos, muito sucesso!

Stephanie Blima e Milena Maia, obrigada pela ajuda durante o experimento. Pamella Lorenci, amiga de tantos anos, obrigada pela ajuda na fazenda e por me mostrar que tudo sempre tem o lado bom. À Ana Pérola por toda a atenção, pelas inúmeras vezes que me ajudou e por ser muito querida comigo. À Karen Nascimento da Silva, muito obrigada pela ajuda na reta final da dissertação. Ao nosso padrinho Luciano Donizeti Varanda pela amizade, companheirismo e ensinamentos em todos os momentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, boa sorte a todos!

À minha família, amigos do Colégio Santa Cruz (G8) e amigas da Universidade Anhembi Morumbi, muito obrigada pelo carinho, por me apoiarem, me ajudarem, me darem força e coragem mesmo sem entender inúmeras vezes o que eu realmente fazia por aqui. Obrigada por aceitarem e respeitarem os momentos em que eu precisei me ausentar e por nunca me cobrarem por isso. À Franciane Corrêa Cardoso que desde a minha graduação me ensina muito na área da veterinária e, hoje em dia, principalmente, sobre a vida. Amo vocês! Obrigada a todos!

À biomédica Cláudia Regina Stricagnolo pela fundamental e inigualável ajuda durante o período em que estive aqui, desde a Iniciação Científica até o mestrado. Muito obrigada por todas as bactérias identificadas, placas na estufa, empréstimos de material e companhia nas tardes de laboratório.

À Samantha Ive Miyashiro por toda a ajuda com o citômetro e pelo carinho de sempre! Muito obrigada! À Dinha por tornar o ambiente mais alegre e engraçado, além de manter sempre os materiais impecáveis para a nossa equipe! Obrigada! À toda equipe dos Laboratórios da FMVZ/USP, Clara Mori, Maria Helena da Silva Pelissari e Marly Elizabeth Ferreira. À Nicolle Gilda Teixeira de Queiroz Hazarbassanov do Laboratório do Departamento de Patologia pelos conhecimentos transmitidos, sempre pronta a ajudar desde a época da Iniciação.

Gostaria de agradecer a toda a equipe da Fazenda Colorado que nos abriu as portas para que o experimento pudesse ser realizado lá. Aos veterinários Natália Meirelles Sobreira e Sergio Soriano, além de todos os funcionários que colaboraram direta ou indiretamente, muito obrigada!

Aos residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) de 2013 a 2016, muito obrigada! Todos vocês sempre nos ajudaram prontamente em algum momento! Em especial aos residentes Rodrigo, Camila, Marcela, Joel, Mailson e Giuliana que nos ajudaram nas coletas do mestrado. Muito obrigada e sucesso para vocês!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão do auxílio de pesquisa (2013/06152-7).

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

Cora Coralina

“Seja quem você for, seja qualquer posição que você tenha na vida, do nível altíssimo ao mais baixo, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus que um dia você chega lá, de alguma maneira você chega lá...”

Ayrton Senna

RESUMO

COSTA, J. F. R. **Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas.** [The influence of colostrum leukocytes in the development of intestinal microbiota, innate immune response, and incidence of diarrhea in newborn calves]. 2016. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência dos leucócitos do colostro bovino na imunidade inata, desenvolvimento da microbiota intestinal e ocorrência de diarreias em bezerras Holandesas recém-nascidas. Para isso, 20 bezerras Holandesas foram acompanhadas nos seguintes momentos: antes da mamada do colostro (D0); 1-2 (D2); 7 (D7); 14 (D14); 21 (D21) e 28 (D28) dias após nascimento e foram 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) de vacas doadoras. **Capítulo 1** – O objetivo deste capítulo foi avaliar a presença e influência dos leucócitos do colostro na colonização do trato gastrointestinal. Para isso, amostras de colostro foram semeadas em TSA e MacConkey para CBT e CCT; e amostras de fezes em agar sangue, MacConkey e *Salmonella-Shiguelia*. Bezerras apresentaram maior frequência de diarreia no D14 (COL+=78%; COL-=60%). O grupo COL- apresentou maior CBT e CCT/mL ($3,93 \times 10^6$ ufc/mL e $3,01 \times 10^5$ ufc/mL) em relação ao COL+ ($0,94 \times 10^6$ ufc/mL e $0,78 \times 10^5$ ufc/mL). Sobre as espécies bacterianas isoladas, as que foram mais frequentes no COL+ foram *Proteus mirabilis* (29,91%), *Escherichia coli* (28,04%), *Citrobacter freundii* (5,61%) e *Staphylococcus* spp (5,61%), no COL- foram *Escherichia coli* (28,70%), *Proteus mirabilis* (27,78%), *Klebsiella pneumoniae* (11,32%) e *Morganella morganii* (5,66%). O momento com maior isolamento em ambos os grupos foi o D2 (COL+ = 26 cepas; COL- = 27 cepas), período em que iniciou a diarreia nas bezerras. Não foi possível detectar diferenças entre as frequências de microrganismos entre os grupos COL+ e COL-. A administração de colostro COL+ e COL- não influenciou na proporção de bactérias aeróbias presentes nas fezes e na ocorrência de diarreia das bezerras durante o período neonatal. **Capítulo 2** – O objetivo deste capítulo foi avaliar a influência dos leucócitos do colostro na resposta imune inata em bezerras Holandesas. Os animais foram

submetidos ao exame clínico, seguido da colheita das amostras sanguíneas para realização das provas laboratoriais. As concentrações de cortisol sérico e haptoglobina não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto a concentração de ferro foi diferente entre os grupos no D7. No leucograma não foi detectada diferença para os leucócitos totais e neutrófilos absolutos, mas houve tendência entre os grupos no D7 para os valores de neutrófilos relativos. O marcador CH138⁺CD62L⁺ não apresentou diferença entre os grupos, apesar da maior expressão ter sido detectada no COL-. A expressão de CH138⁺CD62L⁻ foi maior no COL+ no D14. A fagocitose e produção de H₂O₂ pelos neutrófilos sanguíneos apresentou perfil semelhante em relação ao *S. aureus* e *E. coli* entre os grupos, apesar do COL- apresentar maior intensidade de fagocitose do D7 ao D14. Houve tendência para o aumento da proporção de granulócitos liberando H₂O₂ basal no D14 para o COL-, entretanto o COL+ apresentou tendência para maior intensidade da fagocitose no D21. A proporção de granulócitos (%), estimulados com *S. aureus*, liberando H₂O₂ foi maior no COL+ em D7, enquanto o estímulo com a *E. coli* não resultou em diferenças entre os grupos. A intensidade de fluorescência foi maior e gradual no COL+ quando as células foram estimuladas, porém não foram encontradas diferenças estatísticas. As células do colostro influenciaram no perfil sanitário apresentado pelas bezerras, observando-se maior intensidade de diarreias, menores teores de ferro sérico e anemias no grupo que recebeu colostro congelado. A migração dos granulócitos sanguíneos foi mais rápida e intensa no COL+ em relação ao COL-, após exposição natural aos patógenos causadores de diarreia. O índice de fagocitose (%) dos granulócitos apresentou semelhança entre os grupos, entretanto a intensidade da fluorescência foi mais intensa no COL-. Em contrapartida, o COL+ demonstrou maior habilidade em produzir H₂O₂.

Palavras-chave: Colostro congelado. Colostro fresco. Contagem bacteriana.

Neutrófilos. Fagocitose.

ABSTRACT

COSTA, J. F. R. **The influence of colostrum leukocytes in the development of intestinal microbiota, innate immune response, and incidence of diarrhea in newborn calves.** [Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas]. 2016. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The aim of this study was to evaluate the influence of bovine colostrum leukocytes in innate immunity, in the development of the intestinal microbiota and the occurrence of diarrhea in newborn Holstein calves. For this, 20 Holstein calves were followed in the following moments: before colostrum intake (D0); 1-2 (D2); 7 (D7); 14 (D14); 21 (D21) and 28 (D28) days after birth. They were divided into two experimental groups: COL+ group, which received fresh colostrum (4L) from their mothers; and COL- group which received frozen and acellular colostrum (4L) of donor cows. **Chapter 1 -** The aim of this chapter was to evaluate the presence and influence of colostrum leukocytes in the colonization of the gastrointestinal tract. For this, colostrum samples were seeded in TSA and MacConkey for TPC and TCC; and stool samples on blood agar, MacConkey and Salmonella-Shigella. Calves presented higher frequency of diarrhea in D14 (COL+ = 78%; COL- = 60%). The COL- group showed higher TPC and TCC/mL ($3,93 \times 10^6$ cfu/mL and $3,01 \times 10^5$ cfu/mL) compared to COL+ ($0,94 \times 10^6$ cfu/mL and $0,78 \times 10^5$ cfu/mL). Regarding the isolated bacterial species, those that were more frequent in the COL+ were *Proteus mirabilis* (29.91%), *Escherichia coli* (28.04%), *Citrobacter freundii* (5.61%) and *Staphylococcus spp* (5.61%); in the COL- were *Escherichia coli* (28.70%), *Proteus mirabilis* (27.78%), *Klebsiella pneumoniae* (11.32%) and *Morganella morganii* (5.66%). The moment with more isolation in both groups was the D2 (COL+ = 26 strains; COL- = 27 strains), period in which started the diarrhea in calves. It was not possible to detect differences between the frequencies of microorganisms between the COL+ and COL- groups. The COL+ and COL- colostrum management did not influence the proportion of aerobic bacteria present in feces and the occurrence of diarrhea in calves during the neonatal period. **Chapter 2 –** The aim of this chapter was to evaluate the influence of colostrum leukocytes in the innate immune response in Holstein calves. The animals were

submitted to clinical examination, followed by blood samples collection to perform laboratory tests. The serum cortisol and haptoglobin concentrations did not show statistical differences while the iron concentration was different between groups at D7. The leukogram did not show difference to total leukocytes and absolute neutrophils, but there was a trend between groups at D7 for relative values of neutrophils. The CH138⁺CD62L⁺ marker showed no difference between groups, despite an increased expression was detected in COL-. The expression of CH138⁺CD62L⁻ was greater in COL+ at D14. The phagocytosis and production of H₂O₂ by blood neutrophils showed similar profile in relation to *S. aureus* and *E. coli* between groups, although COL- presented greater phagocytosis intensity from D7 to D14. There was a trend for the increase of granulocyte proportion, releasing basal H₂O₂ at D14 for COL-, however COL+ presented trend to a higher intensity of phagocytosis at D21. The proportion of granulocytes (%) stimulated with *S. aureus* releasing H₂O₂ was greater in COL+ at D7, while stimulation with *E. coli* resulted in no differences between the groups. The fluorescence intensity was higher and gradual in COL+ when cells were stimulated; however, it was not detected statistical differences. The colostrum cells influenced in the health profile presented by the calves, with a higher intensity of diarrhea, lower levels of serum iron and anemia in the group that received frozen colostrum. The migration of blood granulocytes was faster and more intense in COL+ in relation to COL- after natural exposure to pathogens that cause diarrhea. The phagocytosis rate (%) of granulocytes showed similarity between groups, although the fluorescence intensity of COL- was more intense. In contrast, the COL+ demonstrated greater ability in producing H₂O₂.

Keywords: Frozen colostrum. Fresh colostrum. Bacterial count. Neutrophils. Phagocytosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da transferência de leucócitos do colostro materno até a absorção pelo epitélio intestinal dos bezerros recém-nascidos – São Paulo – 2016.....	35
Figura 2 - Resposta imune intestinal para bactérias entéricas e seus antígenos – São Paulo – 2016.....	41
Figura 3 - Nascimento em baias de parição (a); colostragem em baias de transição (b), localizadas na maternidade – São Paulo – 2016	46
Figura 4 - Esfregaço da secreção mamária do colostro fresco fornecido para as bezerras do grupo com células viáveis (COL+) – São Paulo – 2016 ...	48
Figura 5 - Alojamento das bezerras durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016	50
Figura 6 - Escores de fezes adotados para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016.....	52
Figura 7 - Etapas para a diluição seriada e plaqueamento das amostras de colostro fornecido às bezerras (COL+) e (COL-) – São Paulo – 2016	53
Figura 8 - Crescimentos bacterianos na placa de TSA – CBT (a); crescimento de bactérias Gram-negativas na placa com meio de cultura MacConkey (b) – São Paulo – 2016.....	54
Figura 9 - Demonstração da coleta de fezes com luva estéril direto da ampola retal – São Paulo – 2016.....	55
Figura 10 - Fezes foram semeadas no fluxo, na presença do fogo em placas agar sangue, agar MacConkey e SS – São Paulo – 2016	56
Figura 11 - Esquema do procedimento realizado no laboratório para identificação das bactérias aeróbias das fezes – São Paulo – 2016.....	57
Figura 12 - Exemplos dos crescimentos obtidos após 24 a 48 horas de incubação das placas em estufa a 37°C – São Paulo – 2016.....	57
Figura 13 - Frequências (%) do escore fecal em bezerras Holandesas amamentadas com colostro fresco (COL+) e colostro sem células viáveis (COL-) durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016...	61

Figura 14 - Contagem bacteriana total (CBT/mL) e contagem de coliformes totais (CCT/mL) nas amostras de colostro com (COL+) e sem células (COL-) – São Paulo – 2016.....	63
Figura 15 - Correlações entre IgG, contagem bacteriana total (CBT), contagem de coliformes totais (CCT) em amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) - São Paulo – 2016.....	65
Figura 16 - Correlação entre sólidos totais, contagem bacteriana total (CBT), contagem de coliformes totais (CCT) em amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016	66
Figura 17 - Comparação entre as diferentes espécies bacterianas isoladas a partir das fezes das bezerras Holandesas (COL+) e (COL-) durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016.....	71
Figura 18 - Número de isolamentos dos principais gêneros bacterianos isolados nas amostras de fezes das bezerras Holandesas que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016	73
Figura 19 - Nascimento em baias de parição (a); colostragem em baias de transição (b), localizadas na maternidade – São Paulo – 2016	95
Figura 20 - Esfregaço da secreção mamária do colostro fresco fornecido para as bezerras do grupo com células viáveis (COL+) – São Paulo – 2016 ...	97
Figura 21 - Alojamento das bezerras durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016	98
Figura 22 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016.....	100
Figura 23 - Avaliação da proporção de granulócitos no sangue de bezerras Holandesas no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016.....	104
Figura 24 - Ensaio de avaliação da L-selectina – São Paulo – 2016	105
Figura 25 - Ensaio de avaliação do CH138 ⁺ – São Paulo – 2016	105
Figura 26 - Ensaio de avaliação do duplo positivo para CD62L ⁺ e CH138 ⁺ – São Paulo – 2016	106
Figura 27 - Avaliação da proporção de PMN no sangue de bezerras Holandesas – São Paulo – 2016.....	108
Figura 28 - Avaliação da produção de H ₂ O ₂ basal, sem estímulos bacterianos, pelas células PMN com DCFH-DA. Seleção do eixo FL1 ⁺ para	

avaliação da produção de H ₂ O ₂ pelos PMN sem estímulo bacteriano – São Paulo – 2016	108
Figura 29 - Avaliação da fagocitose das células PMN do sangue de bezerras Holandesas que fagocitaram <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> – São Paulo – 2016	109
Figura 30 - Avaliação da produção de H ₂ O ₂ e fagocitose pelas células PMN do sangue de bezerras Holandesas com DCFH-DA e <i>Staphylococcus aureus</i> – São Paulo – 2016.....	110
Figura 31 - Avaliação da produção de H ₂ O ₂ e fagocitose pelas células PMN do sangue de bezerras Holandesas com DCFH-DA e <i>Escherichia coli</i> – São Paulo – 2016.....	111
Figura 32 - Frequência do escore fecal e incidência de diarreia em bezerras Holandesas (COL+) e (COL-) durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016	114
Figura 33 - Frequência de anemias em bezerras Holandesas (COL+) e (COL-) durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	115
Figura 34 - Concentração de cortisol sérico (µg/dL) em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	116
Figura 35 - Haptoglobina sérica em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016.....	118
Figura 36 - Valores de concentração sérica de ferro (µM/L) em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-) - São Paulo – 2016.....	119
Figura 37 - Leucócitos totais (WBC) e neutrófilos (NEUTR) do sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-) - São Paulo – 2016.....	121
Figura 38 - Proporção de granulócitos CH138+ expressando o receptor CD62L em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016	123
Figura 39 - Proporção (%) e intensidade da fagocitose (Média Geométrica– Geo Mean) da fagocitose pelos granulócitos mediante liberação	

espontânea ou estimulados, em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo - 2016..... 128

Figura 40 - Produção de peróxido de hidrogênio (% e intensidade – Média Geométrica – Geo Mean) pelos granulócitos, mediante liberação espontânea ou estimulados, em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) - São Paulo - 2016..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios, mínimos e máximos de imunoglobulinas avaliados pelo colostrômetro e Brix para (COL+) e (COL-) – São Paulo – 2016	59
Tabela 2 - Mediana, mínimo, máximo, média e desvio padrão da CBT/mL ($\times 10^6$ e $\log_{10}$) e CCT/mL ($\times 10^5$ e $\log_{10}$) nas amostras de colostro com (COL+) e sem células (COL-) – São Paulo – 2016	62
Tabela 3 - Distribuição das amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) de acordo com a CBT e CCT/mL – São Paulo – 2016	64
Tabela 4 - Valores de P para a correlação de Pearson em relação às concentrações de IgG e sólidos totais correlacionados com CBT e CCT obtidas a partir das amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016.....	64
Tabela 5 - Frequências (%) e número de isolamentos por gêneros bacterianos nas amostras de fezes das bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) do nascimento aos 28 dias de vida – São Paulo – 2016	68
Tabela 6 - Número de espécies bacterianas e frequência dos isolamentos das amostras de fezes das bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) do nascimento aos 28 dias de vida – São Paulo – 2016	70
Tabela 7 - Concentração de cortisol sérico ($\mu\text{g/dL}$) em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	116
Tabela 8 - Valores da concentração (mg/dL) e densidade óptica (DO) para a haptoglobina sérica em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	117
Tabela 9 - Valores da concentração de ferro sérico ($\mu\text{M/L}$) em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo – 2016	118

Tabela 10 - Médias e desvios-padrão para os leucócitos totais (WBC) e neutrófilos (NEUTR) do sangue de bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) - São Paulo - 2016.....	120
Tabela 11 - Médias e desvios-padrão para as proporções de granulócitos CH138+ expressando o receptor CD62-L em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016	122
Tabela 12 - Proporção (%) e intensidade da fagocitose (Média Geométrica – Geo Mean) e produção de peróxido de hidrogênio pelos granulócitos em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016.....	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Intervalos de referência para as funções vitais em bezerras no primeiro mês de vida	47
Quadro 2 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida	51
Quadro 3 - Escores de broncopneumonia adotados para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida	52
Quadro 4 - Fatores para conversão de números de colônias na placa TSA e MacConkey para CBT/mL ou CCT/mL de colostro	54
Quadro 5 - Intervalos de referência para as funções vitais em bezerras no primeiro mês de vida	96
Quadro 6 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida	100
Quadro 7 - Escores de broncopneumonia adotado para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida	101
Quadro 8 - Ensaio de fagocitose e produção de H ₂ O ₂ do sangue de bezerras Holandesas	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
bpm	Batimentos por minuto
mpm	Movimentos por minuto
T	Temperatura
L	Litros
Igs	Imunoglobulinas
g	gramas
ML	mililitros
m	metro
D	dia
FITC	<i>Fluorescent Isothiocyanate</i>
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCT	Contagem de Coliformes Totais
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
MC	<i>MacConkey</i>
SOL	Solução
SS	<i>Salmonella Shigella</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
h	Horas
mg	miligramas
n	número
DP	Desvio Padrão
mM	milimolar
q.s.p.	quantidade suficiente para
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
nm	Nanômetro
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>

FSC	<i>Forward Scatter</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
PMN	Polimorfonucleares
WBC	<i>White Blood Cells</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
NEUTR	Neutrófilos
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
PI	Iodeto de Propídio
μl	Microlitro
μg	Micrograma
ufc	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
-	Negativo
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
>	Maior que
≤	Menor ou igual que
<	Menor que
=	Igual
G	Força G
β	Beta
*	Diferença estatística
†	Tendência
≥	Maior ou igual que
n°	Número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1	TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA.....	30
2.1.1	Aspectos gerais.....	30
2.1.2	Células do colostro e seus produtos.....	32
2.1.3	Papel das células na resposta imune dos recém-nascidos.....	35
2.1.4	Papel das células do colostro como carreadoras de bactérias	38
2.1.5	Desenvolvimento da Resposta Imune de mucosa intestinal.....	39
 CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DO COLOSTRO NA COLONIZAÇÃO DO INTESTINO POR BACTÉRIAS AERÓBIAS		
42		
3	INTRODUÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	BEZERRAS	46
4.2	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO	50
4.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIÓDICA	51
4.4	ANÁLISES	52
4.4.1	CBT e CCT.....	53
4.4.2	Isolamento das bactérias das fezes.....	54
4.4.2.1	Amostra de fezes.....	55
4.4.2.2	Processamento das amostras de fezes.....	55
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS.....	59
5.1	QUALIDADE DO COLOSTRO	59
5.2	STATUS SANITÁRIO	59
5.2.1	CBT e CCT no colostro	62
5.2.2	Relação entre a CBT / CCT com a concentração de Igs no colostro ...	64
5.2.3	Isolamento enteropatógenos aeróbios.....	66
6	DISCUSSÃO	75
6.1	QUALIDADE DO COLOSTRO	75
6.2	STATUS SANITÁRIO	76

6.2.1	CBT e CCT no colostro	77
6.2.2	Isolamentos bacterianos das fezes	80
7	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO NA RESPOSTA IMUNE INATA DE BEZERRAS HOLANDESAS RECÉM-NASCIDAS 91

8	INTRODUÇÃO	92
9	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
9.1	BEZERRAS	95
9.2	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO	99
9.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIÓDICA	99
9.4	AMOSTRAS	101
9.5	ANÁLISES	101
9.5.1	Hemograma.....	101
9.5.2	Cortisol	102
9.5.3	Haptoglobina.....	102
9.5.4	Ferro	103
9.5.5	Imunofenotipagem dos Neutrófilos	103
9.5.6	Fagocitose e Produção Peróxido de Hidrogênio	106
9.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	112
10	RESULTADOS.....	113
10.1	STATUS SANITÁRIO	113
10.2	CORTISOL	115
10.3	HAPTOGLOBINA	117
10.4	FERRO.....	118
10.5	LEUCÓCITOS TOTAIS E NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS.....	119
10.6	EXPRESSÃO DE MARCADORES NOS GRANULÓCITOS.....	121
10.7	FUNÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	123
11	DISCUSSÃO	130
11.1	QUALIDADE DO COLOSTRO	130
11.2	STATUS SANITÁRIO DAS BEZERRAS.....	131
11.3	CORTISOL	134
11.4	HAPTOGLOBINA	135

11.5	FERRO.....	136
11.6	PROPORÇÃO E FUNÇÃO DOS NEUTRÓFILOS.....	137
12	CONCLUSÕES	142
	REFERÊNCIAS.....	143
13	CONCLUSÃO GERAL	148
	REFERÊNCIAS.....	149
	ANEXOS	153

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os bezerros recém-nascidos são agamaglobulinêmicos, imunossuprimidos e possuem sistema imune específico imaturo ao nascimento, sendo dependentes do colostro materno no primeiro mês de vida (CORTESE, 2009).

O colostro bovino é rico em componentes imunológicos como leucócitos, citocinas e imunoglobulinas (NOCEK; BRAUND; WARNER, 1984; WILLIAMS, 1993; CROSS; GILL, 2000; KORHONEN; MARNILA; GILL, 2000). O papel dos anticorpos do colostro nos mecanismos imunes para a defesa das bezerras recém-nascidas está bem consolidado, entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos que envolvem as células e seus produtos.

As células do colostro são absorvidas pelos enterócitos e transferidas para o sangue e órgãos linfoides das bezerras após colostragem (TUBOLY et al., 1988; LIEBLER-TENORIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002; REBER et al., 2006). A participação dessas células na resposta imune é amplamente aceita, porém pouco se sabe sobre a intersecção e os mecanismos que envolvem as células maternas e a imunidade dos recém-nascidos.

As poucas pesquisas realizadas nesta linha focaram seus estudos na influência dos leucócitos do colostro, através da marcação de linfócitos sanguíneos, na resposta imune de bezerras que ingeriram colostro celular e acelular. A resposta imune inata das bezerras que receberam colostro fresco e congelado foi avaliada apenas por Riedel-Caspari e Schimidt (1991a,b) e Riedel-Caspari (1993).

Diante do contexto apresentado, esta pesquisa avaliou a influência das células do colostro na resposta imune inata e ocorrência de doenças em bezerras Holandesas do nascimento aos 28 dias de vida, motivada pela busca de novas estratégias de manejo de colostro para a otimização da imunidade e sanidade em bezerras, durante a fase de desenvolvimento.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar se os leucócitos do colostro influenciam na colonização da microbiota intestinal, resposta imune inata e na ocorrência de diarreias no período neonatal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este tópico apresentará os principais aspectos relacionados à transferência de imunidade passiva com ênfase no papel das células do colostro em relação à colonização intestinal e desenvolvimento da resposta imune de bezerros recém-nascidos.

2.1 TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA

Os bezerros recém-nascidos são agamaglobulinêmicos, imunossuprimidos e possuem sistema imune específico imaturo ao nascimento, sendo dependentes do colostro materno no primeiro mês de vida (CORTESE, 2009).

2.1.1 Aspectos gerais

O colostro dos bovinos é composto por fatores imunes como imunoglobulinas (Igs), células e seus subprodutos (GONZÁLEZ et al., 2013). Além disso, a secreção mamária também possui elevadas concentrações de gordura, vitaminas solúveis em gordura (retinol, tocoferol e β -caroteno), vitaminas solúveis em água (niacina, tiamina, riboflavina, vitamina B12, piridoxal, piridoxamina e piridoxina), minerais (Ca, P, Mg, Na, K, Zn, Fe, Cu, S e Mn), fatores antimicrobianos (lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase) e fator de crescimento semelhante à insulina que estimula o crescimento dos recém-nascidos (REITER, 1978; TODHUNTER; SMITH; SCHOENBERGER, 1985; KEHOE; JAYARAO; HEINRICHS, 2007).

A qualidade imunológica do colostro tem sido avaliada pelas concentrações de imunoglobulinas (Igs). O colostro bovino é composto por aproximadamente 85-90% de IgG, 5% de IgA e 7% de IgM que atravessam a barreira do epitélio da glândula mamária migrando do fluido extracelular para a glândula mamária através do mecanismo de endocitose (LARSON; HEARY; DEVERY, 1980).

Esta avaliação pode ser feita através do imunoensaio para a determinação direta dos teores de IgG ($\text{IgG} > 50\text{g/L}$), entretanto esse teste é caro e sua leitura deve ser realizada entre 18 a 24 horas de incubação. Este fato torna a escolha de testes rápidos a campo mais adequada, tais como colostrômetro e refratômetro (CHIGERWE et al., 2008; BIELMANN et al., 2010; QUIGLEY et al., 2013). Recentemente foram estabelecidos novos pontos de corte para o teor de IgG ($\text{IgG} \geq 80\text{g/L}$) e sólidos totais ($\geq 23\%$), respectivamente, determinados pelo colostrômetro e refratômetro Brix (BARTIER; WINDEYER; DOEPEL, 2015).

A absorção das Igs pelas células epiteliais intestinais ocorre por pinocitose. Durante as primeiras horas de vida, o abomaso das bezerras apresenta pequena produção de ácido clorídrico, 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 (KRUSE, 1983). No intestino, as Igs se ligam aos receptores Fc dos enterócitos (FcRn) responsáveis pelo transporte ativo dessa substância do lúmen intestinal para a circulação sanguínea dos neonatos. A permeabilidade do epitélio intestinal às macromoléculas ocorre apenas entre as primeiras 18 a 24 horas de vida, possivelmente devido à substituição das células intestinais que expressavam os receptores FcRn (GODDEN, 2008).

A quantidade de colostro fornecida para os bezerros é outro fator importante. Recentemente vem sendo indicado o fornecimento de volume equivalente a 15% do peso vivo ao nascimento, dentro das primeiras 12 horas de vida (PAULA, 2016), entretanto McGuirk e Collins (2004) recomendaram o volume equivalente a 8-10% do peso vivo ao nascimento, considerando que neste volume há a quantidade suficiente de imunoglobulinas necessária para a transferência de imunidade passiva e garantia da saúde e desenvolvimento das bezerras.

Após a ingestão do colostro, os níveis séricos de imunoglobulinas atingem concentrações significativas em poucas horas. Bezerras apresentam falha na transferência de imunidade passiva quando ocorrem concentrações de IgG menores que 10mg/dL , quando avaliadas entre 24 e 48 horas de vida (NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM, 1996; WEAVER et al., 2000).

2.1.2 Células do colostro e seus produtos

Os leucócitos foram observados no colostro humano pela primeira vez por Alexander Donné (1844) ¹ apud Mandyla et al. (1982, p.995). Entretanto, a transferência de imunidade celular da mãe ao recém-nascido foi sugerida no artigo de revisão de Watson (1980).

Estima-se que o colostro bovino possui entre 1×10^6 e $2,5 \times 10^6$ células somáticas/mL, dentre as quais cerca de 32% são viáveis (MCDONALD; ANDERSON, 1981; LIEBLER-TENORIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002; GOMES et al., 2011; SILVA, 2014).

Os leucócitos colostrais apresentam perfil diferenciado em relação ao sangue periférico. A população de leucócitos no colostro de primeira ordenha, colhido até seis horas pós-parto, consiste em 13,3% de neutrófilos, 16,4% de linfócitos, 69,5% de monócitos e células epiteliais e 0,27% de eosinófilos (GOMES et al., 2011). Megank et al. (2014) avaliaram os leucócitos colostrais através da separação das células por centrifugação e densidade de gradiente e obtiveram a proporção de 25,4% de linfócitos T, 2,9% de linfócitos B, e 32,7% de macrófagos.

A avaliação da atividade funcional das células do colostro é limitada pela dificuldade do seu isolamento, devido à quantidade abundante de *debris* celulares, gordura, proteínas e partículas auto-fluorescentes, que dificultam a separação das células do colostro para sua avaliação funcional (GOMES et al., 2014).

Tuboly et al. (1988) foram os primeiros autores a comprovarem a transferência de células do colostro para 23 leitões filhos de quatro porcas (A a D). Os leucócitos do colostro foram isolados por gradiente de densidade com uso de *Ficoll-Paque*, sendo posteriormente coradas com Tecnécio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) em solução de NaCl. Após sete a dez horas de nascimento, 5mL da solução contendo as células marcadas foram injetados por laparotomia diretamente no estômago dos leitões da porca A e no jejuno dos leitões provenientes da porca B. Os leitões oriundos das porcas C e D receberam a suspensão celular através de sonda naso-esofágica. Os animais dos referidos grupos receberam células oriundas do colostro da própria mãe ou doadoras. Três leitões das porcas B e C receberam células inativadas a 56°C.

---

¹ DONNÉ, A. Cours de microscopie: Complementaire des études médicales, v.1, n.1, Bailliere, Paris, 1844.

Após oito horas da aplicação do colostro os animais foram eutanasiados e os fragmentos de duodeno, jejuno e linfonodos foram examinados por autorradiografia.

Tuboly et al. (1988) observaram que os leitões que mamaram colostro oriundo de suas próprias mães apresentaram células colostrais na região cortical dos linfonodos mesentéricos, enquanto os leitões que receberam colostro de doadoras não apresentaram células nos ductos linfáticos, nem nos linfonodos, mas sim no tecido epitelial do intestino. Em leitões que mamaram colostro de suas próprias mães foram encontrados linfócitos no lúmen e frequentemente nas microvilosidades, sozinhos ou agrupados. Em animais que mamaram colostro de doadoras, muitas células colostrais foram encontradas no lúmen intestinal, porém, no epitélio intestinal, foram encontradas apenas ocasionalmente. Assim, os autores concluem que há migração intracelular dos leucócitos do colostro. Não houve absorção de linfócitos que receberam colostro com células inativadas pela alta temperatura.

Tuboly et al. (1995) também confirmaram a transferência de células maternas para ovinos recém-nascidos.

Williams (1993) estudou a absorção intestinal de leucócitos colostrais marcados com FITC em 49 leitões. Este autor observou a presença dos leucócitos marcados na circulação sanguínea dos leitões em duas horas após a alimentação, observando-se pico em relação à presença dessas células entre 5-7 horas após a ingestão. Após 24 horas de ingestão, as células foram encontradas também no fígado, pulmão, linfonodos, baço e tecidos gastrintestinais. Os autores encontraram células marcadas no duodeno e jejuno, porém não foram encontradas células na região do íleo, fora da placa de *Peyer*.

Liebler-Tenorio, Riedel-Caspari e Pohlenz (2002) comprovaram a absorção dos leucócitos do colostro proveniente de vacas através da marcação dessas células. O colostro foi ordenhado em até 15 minutos após o parto e as células separadas por mecanismo de centrifugação. Ao *pellet* celular foi adicionado *fluorescent isothiocyanate* (FITC). Os animais foram anestesiados e através de laparotomia foi obtido acesso a duas regiões do intestino: no jejuno médio onde não existe placa de *Peyer* e na região distal do íleo onde as placas de *Peyer* estão presentes. Nestas regiões foram injetados 10 a 15 mL da suspensão celular contendo as células maternas marcadas. Após 1h30 e 2 horas de exposição, uma porção da alça intestinal de cada região previamente estabelecida foi removida e

fixada com solução de formalina. Em seguida, animais foram eutanasiados com pentobarbital. Os fragmentos teciduais foram submetidos à imuno-histoquímica para a detecção das células maternas.

Liebler-Tenorio, Riedel-Caspari e Pohlenz (2002) detectaram células maternas marcadas no lúmen intestinal, na superfície, entre vilosidades e nas placas de *Peyer* em todos os animais (n=3). Apenas macrófagos e linfócitos puderam ser discernidos pela morfologia. Foi possível notar diferença na quantidade de leucócitos observados no corte intestinal, provavelmente por diferenças na proporção das células efetivamente marcadas ou perda de células durante o procedimento de coloração, considerando que foi injetada a mesma quantidade da suspensão celular (10-15mL). Foram encontradas mais células coradas nos seios ao redor dos folículos linfóides das placas de *Peyer* em comparação ao epitélio e espaço subepitelial, indicando rápido e eficiente transporte através do epitélio. Os autores acreditam que através dos seios linfáticos ocorre a drenagem das células para os linfonodos mesentéricos; além disso, os linfócitos absorvidos do colostro podem recircular e serem encontrados em outros órgãos e tecidos que não o intestino.

Reber et al. (2006) compararam o efeito do colostro acelular e sem gordura (congelados a -20°C), acrescidos de células mononucleares do sangue periférico materno, na resposta imune de bezerros recém-nascidos. As células foram isoladas do sangue e marcadas com substância fluorescente (PKH26-GL, lido em FL2), sendo administradas aos bezerros com seis horas de nascimento. Foram coletadas amostras sanguíneas dos bezerros com 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas pós ingestão do colostro. As células maternas no colostro foram encontradas na corrente sanguínea de bezerros, avaliando assim, a capacidade de absorção e sua resposta imune. A circulação destas células nos recém-nascidos foi monitorada por citometria de fluxo. Os autores observaram que células maternas marcadas ganharam a circulação dos bezerros após absorção pelo epitélio intestinal. Os autores consideraram que o fenótipo das células maternas da glândula mamária pode facilitar a transferência dos leucócitos maternos para a circulação do neonato. O pico de leucócitos na circulação sanguínea dos bezerros ocorreu entre 12 a 24 horas após a ingestão do colostro e grande parte das células que foram marcadas, foram encontradas no sangue e, por fim, as células marcadas desapareceram da circulação após 36 horas de ingestão do colostro (Figura 1).

Reber et al. (2006) compararam bezerros que mamaram colostro fresco, colostro com células mononucleares periféricas oriundas do sangue materno marcadas com substância fluorescente, com bezerros que mamaram colostro acelular. Os autores encontraram em seu experimento maior quantidade de expressão de receptores indicativos de inflamação no grupo que mamou colostro sem células (CD11a, CD11c, CD43 e CD62L).

Figura 1 - Esquema da transferência de leucócitos do colostro materno até a absorção pelo epitélio intestinal dos bezerros recém-nascidos – São Paulo – 2016

Fonte: adaptado de: Reber (2000) por Costa, J. F. R. (2016)

2.1.3 Papel das células na resposta imune dos recém-nascidos

Experimentos recentes têm demonstrado que a presença das células no colostro é um diferencial na resposta imune das bezerras recém-nascidas. Entretanto, o papel destas células nos diferentes mecanismos da resposta imune que conduzem ao amadurecimento imunológico das bezerras ainda são pobremente compreendidos.

Riedel-Caspari (1993) administrou 10^9 unidades formadoras de colônia da *Escherichia coli* enteropatogênica de forma oral para 20 bezerros em até três horas pós-nascimento. Após a infecção e durante os próximos dois dias, 10 bezerros receberam *pool* de colostro suplementado com células colostrais (COL+) e 10 bezerros receberam *pool* de colostro acelular (COL-). As bezerras pertencentes ao grupo COL+ excretaram significativamente menor quantidade de bactérias *E. coli* enteropatogênica nas fezes durante a primeira semana após a infecção e atingiram o limite mínimo de detecção antes que o grupo COL-. A concentração de IgA e IgM específicos contra *E. coli* no soro das bezerras COL+ foi significativamente superior no período pós-natal do que no grupo COL-, e permaneceu um pouco acima durante todo o período estudado.

Reber et al. (2008a) buscaram entender o impacto que as células do colostro materno, quando absorvidas pelo epitélio intestinal, causam no desenvolvimento do sistema imune dos recém-nascidos, avaliando a resposta adaptativa por meio da fenotipagem de linfócitos. Para isso, 10 bezerros foram alimentados com colostro com (COL+) e sem (COL-) células. Amostras de sangue foram colhidas semanalmente durante o primeiro mês de vida. Todos os bezerros apresentaram uma baixa quantidade de anticorpos circulantes ao nascimento, e após a ingestão do colostro, receberam quantidade semelhante de IgG, o que aumentou a concentração sérica de IgG no sangue para aproximadamente 4.000 mg/dL.

Reber et al. (2008a) também observaram que os bezerros que receberam colostro acelular (COL-) apresentaram maior número e intensidade de fluorescência para os linfócitos expressando CD11a, quando comparados ao grupo que recebeu colostro com células (COL+). O CD11a é relacionado pelos autores como um marcador que indica inflamação sistêmica, sugerindo aumento na susceptibilidade dos bezerros que não receberam leucócitos colostrais aos desafios ambientais e agentes infecciosos. Bezerros COL- apresentaram demora no desenvolvimento do sistema imune em 1 a 2 semanas quando comparados ao COL+, demonstrada pela baixa expressão de receptores CD25+ e CD26+ pelos linfócitos e produção de citocinas abaixo do valor considerado ótimo para as células responsivas. A expressão de MHC de classe I rapidamente aumentou durante a primeira semana de vida em ambos os grupos. Os autores concluem que cada vez mais tem sido comprovado que as células do colostro representam uma importante arma para o desenvolvimento do sistema imune do recém-nascido e que o grupo que mamou

colostro com células apresentou uma menor expressão dos marcadores que estão relacionados com ativação linfocitária e estresse fisiológico.

Reber et al. (2008b) também examinaram o efeito dos leucócitos do colostro materno no desenvolvimento e maturação das células apresentadoras de antígeno dos neonatos. Ao nascimento, bezerros receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-). Semanalmente, amostras de sangue foram coletadas e marcadores de células associadas com estresse fisiológico da linhagem dos monócitos foram adicionados aos leucócitos sanguíneos. A maior diferença encontrada entre os marcadores ocorreu nos primeiros sete dias de vida. Os bezerros que receberam colostro sem células apresentaram maior expressão dos marcadores indicativos de processos inflamatórios (CD11a, CD11c e CD14), quando comparados com o grupo que mamou colostro com células. Os bezerros do COL- apresentaram um aumento no número de monócitos no sangue periférico durante as primeiras duas semanas, entretanto, essas células apresentaram menores níveis de expressão do CD25 e MHC de classe I comparado com o grupo COL+, que apresentou maior ativação celular e apresentação de antígenos. Os autores demonstram assim que a transferência de leucócitos colostrais afeta a maturação da linhagem celular de monócitos. Isso inclui um aumento na capacidade de apresentação de antígeno, como indicado pelo aumento do MHC de classe I nos monócitos.

Langel et al. (2015) examinaram o efeito das células do colostro materno na saúde e perfil imune das células de bezerras leiteiras, tendo como hipótese que bezerras alimentadas com colostro fresco, contendo células viáveis (COL+), teriam níveis de parâmetros sanguíneos aumentados no primeiro mês de vida, quando comparados aos bezerros que fossem alimentados com colostro sem células viáveis (COL-). Para isso, 37 bezerras das raças Holandesas e Jersey receberam colostro fresco com (COL+) e sem células viáveis (COL-). O colostro fornecido foi de boa qualidade (índice Brix > 32%). Os momentos avaliados foram: antes da mamada do colostro (0h), 6h, D1, D3, D7, D14, D21 e D28. As células sanguíneas foram avaliadas através da imunofenotipagem, além do acompanhamento da sanidade por meio dos escores de fezes e broncopneumonia.

Langel et al. (2015) não observaram diferenças para os tratamentos nas concentrações de IgG, IgM e IgA antes e depois da ingestão do colostro. Não foram encontradas diferenças para o perfil sanitário das bezerras durante o estudo. O momento de maior ocorrência de diarreias ocorreu no D14 para ambos os grupos.

Escores respiratórios aumentaram para os dois grupos no D12. O grupo COL- apresentou valores inferiores de T auxiliar $CD4^+$ e $TCD4^+CD62L^+CD45RO^-$ no D1, e menos também de $TCD4^+CD62L^+CD45RO^+$ no D1 e D3 do COL-, quando comparado ao COL+. Em contrapartida, as bezerras COL- apresentaram maior expressão de $TCD4^+CD62L^-CD45RO^+$ com 6h de vida, 1, 3 e 7 dias e maior proporção de monócitos no D7. A diferença entre a proporção de células $CD4^+CD62L^+CD45RO^-$ no D1 para o grupo COL- pode ser explicado pela migração das células que expressam CD62L através do intestino para o sangue. Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos para as células T gamma-delta. Desta forma, os autores concluem que a transferência de células imunes intactas através do colostro fresco pode desempenhar um papel importante no *status* imune do neonato. Aumentando a capacidade imune da bezerra recém-nascida, aumentará a resistência a doenças, resultando em animais saudáveis para o rebanho.

2.1.4 Papel das células do colostro como carreadoras de bactérias

O papel das células do colostro como carreadoras de bactérias maternas para o intestino dos recém-nascidos tem sido suscitado. O isolamento de microrganismos do colostro humano empregando-se técnicas tradicionais de cultivo bacteriano tem sido mal sucedida. Entretanto, material genético de bactérias intestinais tem sido detectado no interior das células presentes na secreção mamária em humanos (PÉREZ et al., 2007).

Em bovinos, bactérias do grupo *Staphylococcus* foram detectadas a partir das células do colostro cultivadas em meio enriquecido para *Staphylococcus* (24/72), ágar sangue (26/72) e manitol (32/72). As principais células identificadas no colostro foram células apresentadoras de antígenos - macrófagos (ADKINS et al., 2015).

A similaridade entre a microbiota das fezes e leite materno com as fezes dos recém-nascidos tem suscitado a hipótese de que existe uma via entero-mamária, na qual as bactérias do intestino materno são capturadas pelas células dendríticas e transferidas para a secreção mamária. A maior biodiversidade bacteriana presente nas células dendríticas de mulheres gestantes e lactentes, quando comparada com

as não gestantes e não lactentes, reforçam a retro-referida hipótese (PÉREZ et al., 2007).

Os microrganismos apresentam padrões repetidos em sua superfície conhecidos como *PAMPs* (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) reconhecidos pelos *PRRs* (*Pattern Recognition Receptors*) presentes nas células apresentadoras de antígenos. Acredita-se que as células maternas migram para os linfonodos mesentéricos e Placa de *Peyer*, induzindo a ativação e diferenciação dos linfócitos *naïve*.

2.1.5 Desenvolvimento da Resposta Imune de mucosa intestinal

A resposta imune inata das mucosas possui mecanismos para impedir o contato dos microrganismos residentes com o epitélio intestinal e circulação sistêmica, pois não são inócuos e podem induzir resposta inflamatória intensa e sepse (BRANDTZAEG, 2010; VERHASSELT, 2010; RESCIGNO, 2011; KOBOZIEV et al., 2014).

Mecanismos da imunidade inata impedem o contato e destroem microrganismos da microbiota residente para controle populacional. A barreira intestinal é composta por muco e fatores antimicrobianos, secretados por diferentes tipos celulares que compõem a mucosa intestinal, como as células *Globet* que secretam grande quantidade de muco e proteína glicosilada altamente resistente à digestão enzimática. A perda da camada de muco, penetração e aderência de bactérias ao epitélio intestinal pode desencadear processo inflamatório. Outras células epiteliais intestinais secretam potentes peptídeos microbianos como a lecitina, capazes de destruir diretamente bactérias Gram-positivas. Células *Paneth* localizadas nas criptas intestinais secretam defensinas e catelicidinas que permeabilizam a membrana das bactérias. Também são produzidas lipocalina-2 e catepsina-K (BRANDTZAEG, 2010; VERHASSELT, 2010; RESCIGNO, 2011; KOBOZIEV et al., 2014).

A secreção de IgA é outro mecanismo usado para impedir o contato da bactéria com o epitélio intestinal. Evidências sugerem que as células dendríticas da Placa de *Peyer* do intestino delgado podem penetrar o epitélio intestinal, capturando

continuamente a microbiota residente do lúmen intestinal via endocitose. Estes microrganismos são carregados pelas células dendríticas aos linfonodos mesentéricos ou permanecem na Placa de *Peyer*, induzindo a ativação e diferenciação das células B *naïve* para produção de IgA específica para bactérias comensais. Estas células migram através da circulação sistêmica para a lâmina própria do epitélio intestinal e secretam IgA no interstício intestinal. As IgA são transportadas pelas células epiteliais até seu ápice e secretadas no lúmen intestinal para ligar-se à microbiota residente, limitando sua habilidade em penetrar a mucosa intestinal (BRANDTZAEG, 2010; KOBOZIEV et al., 2014).

Em função do grande número de bactérias no lúmen intestinal, é inevitável que algumas consigam violar a barreira epitelial e alcançar a lâmina própria. Neste caso, os invasores encontram a segunda linha de defesa do sistema imune composta por fagócitos. Geralmente estes microrganismos são fagocitados e destruídos por macrófagos intestinais através de ação enzimática ou produção de radicais livres. É importante ressaltar que macrófagos intestinais produzem menores concentrações de citocinas pró-inflamatórias que aqueles da circulação sistêmica para limitação do processo inflamatório. Além disso, o macrófago intestinal é extremamente hábil para reparação tecidual (BRANDTZAEG, 2010; VERHASSELT, 2010; RESCIGNO, 2011; KOBOZIEV et al., 2014).

Os microrganismos que colonizam a microbiota intestinal podem ajudar a suprimir respostas imunes inadvertidas que poderiam ser desencadeadas por outros patógenos (SARTOR, 2008).

Microrganismos invasores dispararam resposta imune envolvendo células T, associadas a macrófagos e células mielóides. Antígenos associados às células dendríticas nos linfonodos mesentéricos podem ativar, diferenciar e proliferar células T para produzir resposta Th1 (celular) ou Th17. Estas células também migram dos linfonodos para a lâmina própria intestinal onde estão as bactérias residentes, via circulação sistêmica. Células Th1 e Th17 liberam citocinas pró-inflamatórias, como IFN-gama, IL-17, IL-22, IL-21 e TNF-alfa, que ativam células apresentadoras de antígeno presentes no tecido (macrófagos), resultando na geração adicional das citocinas pró-inflamatórias IL-1 beta, IL-6, IL-8 e IL-12 e espécies reativas do oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio) e óxido nítrico. Estes mediadores inflamatórios amplificam a atividade microbida de macrófagos e aumentam a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VICAM-1 e E-selectina) na superfície

das células endoteliais, facilitando o recrutamento adicional de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o tecido epitelial, colaborando com a defesa do hospedeiro. A supressão da resposta inflamatória é realizada pelas células T CD4⁺ reguladoras (Treg). As bactérias também podem ser fagocitadas por endocitose diretamente pelas células dendríticas e seguirem diretamente para os linfonodos mesentéricos realizando o mesmo processo de apresentação aos linfócitos T e expansão clonal (AUJLA; DUBIN; KOLLS, 2007; BRANDTZAEG, 2010; VERHASSELT, 2010; IVANOV; LITTMAN, 2011; RESCIGNO, 2011; KOBOZIEV et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2 - Resposta imune intestinal para bactérias entéricas e seus antígenos – São Paulo – 2016

Fonte: adaptado de: Mowat (2003); Koboziev et al. (2014) por Costa, J. F. R. (2016).
 Legenda: Gut: intestino; Peyer's Patch: placa de Peyer

**CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DO COLOSTRO NA COLONIZAÇÃO
DO INTESTINO POR BACTÉRIAS AERÓBIAS**

3 INTRODUÇÃO

O colostro apresenta uma diversidade de bactérias que possuem duas origens distintas: microbiota materna e aquelas oriundas do processo de contaminação entre a colheita e o fornecimento de colostro para as bezerras. O papel das bactérias oriundas destes distintos grupos ainda é pobremente discutido no que se refere à espécie bovina.

McGuire e McGuire (2015) ressaltam que a secreção mamária pode ser considerada um probiótico devido à presença de microrganismos oriundos da microbiota materna.

Staphylococcus, *Streptococcus* e *Enterobacteriaceae* representam os principais grupos de bactérias aeróbias isoladas no leite materno humano (MARTIN et al., 2012). O perfil de bactérias aeróbias também foi determinado no colostro e leite de vacas em transição, observando-se a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Serratia* (SILVA, 2014).

Bifidobacterium e *Lactobacillus* são os principais anaeróbios isolados no leite materno humano (MARTIN et al., 2009), porém estes dados ainda não foram relatados para os bovinos.

A importância das células do colostro como carreadoras de bactérias maternas participantes do processo de colonização do intestino dos recém-nascidos tem sido suscitada. Em bovinos, bactérias do grupo *Staphylococcus* foram detectadas a partir das células do colostro cultivadas em meio enriquecido para *Staphylococcus* (24/72), agar sangue (26/72) e manitol (33/72). As principais células identificadas no colostro foram células apresentadoras de antígenos - macrófagos (ADKINS et al., 2015).

Apesar da conotação positiva das bactérias do colostro provenientes da microbiota materna, as pesquisas em bovinos têm sido focadas na presença do grupo de bactérias oriundas da contaminação desse alimento da ordenha à mamadeira das bezerras recém-nascidas. Nesta linha, os pesquisadores da área buscam alternativas para reduzir a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de coliformes totais (CCT) nas amostras de colostro fornecidas às bezerras.

Godden et al. (2012) comprovaram que a pasteurização do colostro a 60°C por 30 minutos reduziu a CBT e CCT/mL (Log_{10} = 3,5 e 2,1; respectivamente) em relação ao colostro fresco (Log_{10} = 5,6 e 4,7; respectivamente). A CBT e CCT/mL apresentou correlação negativa com a concentração sérica de IgG, fato que explica a maior incidência de diarreias e doenças totais nas bezerras que receberam o colostro fresco.

Elizondo-Salazar e Heinrichs (2009) também determinaram o efeito do uso de três diferentes tratamentos de colostro: sem aquecimento e congelado a -20°C imediatamente após ordenha – baixa concentração de bactérias; pasteurização: 60°C por 30 minutos e em seguida congelados a -20°C; e sem aquecimento – alta concentração de bactérias devido à exposição ambiental do colostro por 24 horas a 20°C. Os valores encontrados para CBT/mL e CCT/mL (log_{10}) foi igual a 3,97 e 2,02; 5,61 e 3,16; 2,81 e 0,00 para os grupos sem aquecimento – baixa bactéria, sem aquecimento – alta bactéria e pasteurização, respectivamente. As amostras de colostro foram descongeladas e examinadas para *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Streptococcus* ambiental, não-coliforme Gram-negativos, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, de acordo com Jayarao et al. (2004). Não foram observadas diferenças entre as concentrações de IgG em relação aos grupos experimentais.

Muitas propriedades vêm utilizando colostro pasteurizado com o intuito de diminuir a contaminação por microrganismos. Neste processo, o colostro é submetido a alta temperatura (60°C) e os leucócitos presentes nessa secreção são destruídos (GODDEN et al., 2012). Apesar deste fato, Johnson et al. (2007) não encontraram alterações no número total de leucócitos periféricos, neutrófilos e linfócitos em animais que receberam colostro fresco ou pasteurizado.

A colonização bacteriana do intestino é um processo complexo, que se inicia em pequena escala durante o período fetal, que é comprovada pela presença de bactérias no líquido amniótico, mecônio e cordão umbilical de recém-nascidos humanos. O contato com microrganismos pertencentes à microbiota vaginal, intestinal e mamária da mãe, além daqueles pertencentes ao meio ambiente ao qual o neonato está inserido, intensifica o processo de colonização intestinal após seu nascimento. A composição da microbiota materna, local, forma de nascimento e padrão de dieta desempenham importante papel na colonização intestinal (MARTIN et al., 2012).

Staphylococcus, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterobacteriaceae* são os principais grupos bacterianos isolados no leite materno e fezes de recém-nascidos humanos (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).

O perfil da microbiota das fezes das bezerras em aleitamento parece ser semelhante aos humanos, observando-se predomínio de coliformes, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nos primeiros 21 dias de vida (RADA et al., 2006; VLKOVÁ; TROJANOVÁ; RADA, 2006).

As pesquisas relatadas buscaram bactérias específicas e não foram encontrados trabalhos que avaliassem o perfil dos microrganismos nas fezes das bezerras por métodos tradicionais de cultivo. A desvantagem desta metodologia está associada à ineficiência na detecção de anaeróbios como os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Por outro lado, a identificação destes microrganismos requer o emprego de técnicas de biologia molecular que exige treinamento e maior investimento financeiro.

Apesar da grande relevância dos bovinos para a economia mundial, muitos aspectos da sua biologia são ainda desconhecidos, incluindo a composição da sua microflora normal e alterações relacionadas às doenças. A diversidade da população bacteriana em bovinos ainda é muito pouco conhecida. Saber a complexidade e ecologia de microrganismos presentes no intestino dos bovinos, principalmente no período neonatal e suas alterações decorrentes das mudanças na forma de aleitamento e alimentação é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias eficazes para reduzir ou bloquear os distúrbios gastrintestinais.

A hipótese desta pesquisa é de que as células do colostro bovino influenciam no perfil de enterobactérias aeróbias do trato gastrintestinal de bezerras Holandesas recém-nascidas. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se o fornecimento de colostro com (fresco) e sem células viáveis (congelado) influencia na proporção das espécies de bactérias aeróbias do trato gastrintestinal e ocorrência de diarreias no período neonatal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 2934/2013.

4.1 BEZERRAS

As bezerras desta pesquisa eram oriundas de fazenda comercial de alta produção, localizada no município de Araras – São Paulo. Este experimento foi conduzido de julho a outubro de 2014.

Os partos foram assistidos pelos funcionários e veterinários da propriedade para auxílio obstétrico, separação das recém-nascidas e controle do manejo de colostro (Figura 3).

A equipe de pesquisa era acionada assim que os funcionários detectavam o início do trabalho de parto para o deslocamento de pessoal e preparo do material para a colheita das amostras.

Figura 3 - Nascimento em baias de parição (a); colostragem em baias de transição (b), localizadas na maternidade – São Paulo – 2016

(a)

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

(b)

Bezerras híidas advindas de partos eutócicos foram selecionadas por meio do exame clínico geral, segundo os procedimentos descritos por Dirksen et al. (2008). Foram aferidas as frequências cardíaca (FC), respiratória (FR) e temperatura corpórea (Quadro 1). Outros critérios foram usados para determinar a vitalidade das bezerras, tais como: tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração das mucosas oculares (RODRIGUES, 2008).

Quadro 1 - Intervalos de referência para as funções vitais em bezerras no primeiro mês de vida

Parâmetros	Intervalos de Referência				
	1 hora após nascimento	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
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

Fonte: (SILVA et al., 2016, no prelo)²

Vinte bezerras híidas foram triadas e distribuídas em dois grupos denominados COL+ (n=10) e COL- (n=10). As bezerras do grupo COL+ receberam colostro fresco com células proveniente de suas respectivas mães, enquanto os animais COL- receberam colostro congelado sem células viáveis, oriundo de vacas doadoras.

Vacas e doadoras foram ordenhadas imediatamente após a parição em tronco de contenção localizado no interior da maternidade. Inicialmente foi realizada a lavagem com solução clorada e secagem dos tetos com papel toalha individual.

O colostro das doadoras foi armazenado pelos funcionários da fazenda em garrafas plásticas de 2L, mantidas sob refrigeração (4 - 8°C), por 24 horas. Por fim, as garrafas foram estocadas a -20°C durante o período mínimo de 24 horas e máximo de 3 meses.

Inicialmente, para justificar a ausência de leucócitos viáveis nas amostras congeladas, foi realizado um projeto piloto pela equipe. Alíquotas de colostro fresco,

² SILVA, B. T.; HENKLEN, A.; MARQUES, R. S.; OLIVEIRA, P.; L.; LEITE, S. B. P.; NOVO, S. M. F.; BACCILI, C. C.; REIS, J. F.; GOMES, V. Vital parameters of Holstein calves from birth to weaning. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. [200-]. (no prelo).

refrigerado e congelado foram avaliadas quanto à sua viabilidade celular, de hora em hora, durante as primeiras seis horas e, após, entre 18-24 horas. Com esse estudo foi possível comprovar que as amostras de colostro congeladas não apresentaram viabilidade celular após o congelamento (0%) desde os momentos iniciais (NOVO et al., 2014).

A avaliação indireta da concentração de Igs do colostro foi realizada por meio de colostrômetro e refratômetro Brix (23-32%). 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-.

A quantidade de células somáticas (1,9 milhões/mL; $\log_{10}$: 6,28) encontrada no colostro foi estimada a partir das amostras de colostro fresco utilizando-se como metodologia a contagem microscópica direta adaptada por Gomes et al. (2011) (Figura 4).

Figura 4 - Esfregaço da secreção mamária do colostro fresco fornecido para as bezerras do grupo com células viáveis (COL+) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: (a) macrófagos presentes em predominância no colostro; (b) neutrófilo; (c) glóbulos de gordura.

A primeira garrafa de colostro foi descongelada lentamente a 37°C para alimentar as bezerras COL- dentro das primeiras seis horas de vida. A segunda alimentação foi realizada no intervalo máximo de doze horas de vida, utilizando-se outra garrafa de colostro descongelado.

Bezerras COL+ foram alimentadas com dois litros de colostro fresco nas primeiras seis horas de vida. O colostro para a segunda mamada foi mantido sob refrigeração a 4°C, levemente aquecido a 37°C pouco antes da sua administração entre seis a 12 horas pós-nascimento.

A cura do umbigo foi realizada 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 COL+ e COL- foram mantidas inicialmente nas baias dentro da maternidade, local onde foram realizados os exames clínicos iniciais, colostragem e cura do umbigo, sendo posteriormente transferidas para o bezerreiro às 6 horas de vida, onde permaneceram em baias de transição feitas de madeira não suspensas até os primeiros três primeiros dias pós-nascimento. Por fim, os animais foram transferidos e permaneceram em gaiolas de metal individuais suspensas, medindo 1,2m x 1m, em local com capacidade para 100 gaiolas (Figura 5).

Figura 5 - Alojamento das bezerras durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: (a) alojamento das bezerras recém-nascidas durante as primeiras horas de vida para exame clínico geral, colostragem e cura do umbigo; (b) baia de transição não suspensa onde ficaram até o terceiro dia de vida; (c) bezerreiro para onde as bezerras foram transferidas e permaneceram até o fim do experimento.

A partir deste momento, os animais foram alimentados em baldes, duas vezes ao dia, sendo fornecido um total de seis litros de leite sem antibiótico proveniente do rebanho, além do fornecimento de ração comercial³ e água *ad libitum*.

4.2 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

As bezerras foram avaliadas periodicamente logo após o nascimento (D0), entre 24 a 48 horas de vida (D2) e nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-nascimento (D7 a D28).

³ Rumileite 20®, Guabi

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIÓDICA

Os animais foram avaliados clinicamente utilizando-se os escores de diarreia e broncopneumonia de acordo com o *Calf Heath Scoring Criteria* previamente publicado na *University of Wisconsin - Madison* (McGUIRK, 2008).

A consistência das fezes foi categorizada em escores, sendo 0 – consistência normal, 1 – consistência pastosa e semi-formada, 2 – consistência aquosa com maior quantidade de água, com conteúdo fecal aderido no períneo e cauda, 3 – líquida, conteúdo fecal aderido no períneo e cauda. Diarreia foi considerada quando o escore obtido foi 2 ou 3 (Quadro 2 e Figura 6).

Broncopneumonia foi estabelecida considerando-se os seguintes parâmetros: temperatura retal, tosse, secreção nasal e ocular e posição de orelhas. Para cada item foi atribuído o escore de zero a 3 de acordo com a severidade dos sintomas. A soma dos sintomas acima de 5 foi utilizada para a detecção da Doença Respiratória Bovina (Quadro 3).

A região umbilical externa foi avaliada por inspeção e palpação periódica para a detecção de sinais inflamatórios.

Quadro 2 - 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
Pastosa, semi-formada	1
Pastosa com maior quantidade de água: permanece sobre a “cama”; conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda	2
Líquida: aquosa, conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda	3

Fonte: (McGUIRK, 2008).

Figura 6 - Escores de fezes adotados para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Quadro 3 - Escores de broncopneumonia adotados para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida

Escores	Temperatura retal (°C)	Tosse	Secreção nasal	Secreção ocular	Posicionamento das orelhas
0		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 repetida quando estimulada, ou ocasional quando espontânea	Excessiva, mucosa e bilateral	Moderada quantidade bilateral	Ligeiramente pendente, unilateral
3	≥ 39,4	Presente, repetida e espontânea	Abundante, mucopurulenta, bilateral	Intensa quantidade, bilateral	Pendentes intensamente, bilateral ou torção da cabeça

Fonte: (POULSEN; McGUIRK, 2009).

4.4 ANÁLISES

A contagem bacteriana total (CBT) e de coliformes totais (CCT) do colostro foi analisada através da cultura das amostras em meio *Tryptic Soy agar* (TSA) (Anexo A) e agar *MacConkey* (MC) (Anexo B).

4.4.1 CBT e CCT

Amostras de colostro fornecidas às bezerras dos grupos COL+ e COL- foram coletadas de forma asséptica de dentro da mamadeira e armazenadas em tubos plásticos estéreis com capacidade para 15 mL. Os tubos foram armazenados em freezer a -80°C até o momento do processamento das amostras.

Amostras de colostro foram descongeladas até 4°C , homogeneizadas com o uso de vortex e submetidas a 5 diluições seriadas 1:10. Cada diluição foi pipetada (100 μL) em placa de Petri contendo meio agar MacConkey para a CCT e meio TSA para a CBT, conforme descrito por Godden (2012) (Figuras 7 e 8). As placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C , e o número de colônias foi convertido para ufc/mL de acordo com quadro 4.

Figura 7 - Etapas para a diluição seriada e plaqueamento das amostras de colostro fornecido às bezerras (COL+) e (COL-) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: SOL: Solução

Figura 8 - Crescimentos bacterianos na placa de TSA – CBT (a); crescimento de bactérias Gram-negativas na placa com meio de cultura MacConkey (b) – São Paulo – 2016

(a)

(b)

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Quadro 4 - Fatores para conversão de números de colônias na placa TSA e MacConkey para CBT/mL ou CCT/mL de colostro

Diluição 10^{-1}	Multiplicar o n° de colônias que cresceram na placa por 100
Diluição 10^{-2}	Multiplicar o n° de colônias que cresceram na placa por 1.000
Diluição 10^{-3}	Multiplicar o n° de colônias que cresceram na placa por 10.000
Diluição 10^{-4}	Multiplicar o n° de colônias que cresceram na placa por 100.000
Diluição 10^{-5}	Multiplicar o n° de colônias que cresceram na placa por 1.000.000

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

4.4.2 Isolamento das bactérias das fezes

A colonização bacteriana do trato gastrointestinal das bezerras foi analisada através da cultura das fezes em meio agar sangue de carneiro 5% (Anexo C), agar *MacConkey* e *Salmonella-Shigella* (SS) (Anexo D).

4.4.2.1 Amostra de fezes

As amostras de fezes foram obtidas usando luvas estéreis, diretamente da ampola retal e foram armazenadas em tubos coletores universais estéreis (Figura 9). Em seguida, uma alça flexível foi utilizada para coletar amostra de dentro do tubo coletor que foi transferida para tubos de vidro contendo meio de transporte Tetracionato (10mL) (Anexo E) e Iodo-Iodeto (200 μ L) (Anexo F). Ambas as amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C e processadas no prazo máximo de seis horas.

Figura 9 - Demonstração da coleta de fezes com luva estéril direto da ampola retal – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

4.4.2.2 Processamento das amostras de fezes

Ao chegarem no laboratório, as amostras no frasco com tetracionato foram incubadas em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C. Após 24 horas de incubação o frasco foi homogeneizado e a amostra foi semeada na placa contendo agar *Salmonella-Shigella* (SS) nas condições descritas por Edwards; Ewing (1972).

As amostras mantidas no tubo coletor universal foram semeadas em placas contendo agar sangue, agar *MacConkey* e SS. As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas. Após 24 horas de incubação, as placas que apresentaram crescimento foram retiradas e protegidas em papel filme para melhor armazenamento na geladeira até o momento da realização da série bioquímica. As outras que não apresentaram crescimento nas primeiras 24 horas foram mantidas na estufa até completarem 48 horas (Figuras 10 a 12).

Os microrganismos foram identificados segundo suas características de cultivo morfo-tintoriais e séries bioquímicas com os açúcares: fenilalanina, citrato, indol, vermelho de metil, avaliação da motilidade, produção de gás, lisina e ornitina (KRIEG; HOLT, 1984) (Figura 11).

Figura 10 - Fezes foram semeadas no fluxo, na presença do fogo em placas agar sangue, agar *MacConkey* e SS – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Figura 11 - Esquema do procedimento realizado no laboratório para identificação das bactérias aeróbias das fezes – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Figura 12 - Exemplos dos crescimentos obtidos após 24 a 48 horas de incubação das placas em estufa a 37°C – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

4.5 ANÁLISE 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 $P \leq 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ (*) e $< 0,1$ (†).

Os dados da CBT e CCT inicialmente foram submetidos a uma transformação logarítmica de base 10 para que fosse possível a realização de análise paramétrica. Sendo assim, o teste *T* de *Student* para amostras independentes foi adotado para comparação dos valores obtidos no colostro com (COL+) e sem células (COL-), e a análise de variância (ANOVA) realizada para comparação entre os tempos (D0 a D28) dentro do mesmo grupo. No caso onde ocorreram as transformações logarítmicas, o *p* apresentado nas tabelas diz respeito aos testes relacionados com os valores em $\log_{10}$, enquanto os valores descritos são reais.

As espécies e gêneros bacterianos obtidos a partir das fezes estão apresentas em frequências. As espécies que obtiveram frequência superior a 5% foram submetidas ao teste Qui-quadrado e Exato de *Fisher* para verificar se houve associação com o tipo de colostro oferecido (COL+/COL-) e com a presença de diarreia.

Nem todas as bezerras apresentaram sinais clínicos de doenças, entretanto, as frequências positivas e negativas de escore para cada parâmetro foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado.

A correlação das IgG com as bactérias do colostro nos dois grupos COL+ e COL- foram realizadas a partir da correlação de *Pearson*.

5 RESULTADOS

Este trabalho avaliou a influência das células do colostro na colonização do trato gastrointestinal de bezerras Holandesas no período neonatal.

5.1 QUALIDADE DO COLOSTRO

A avaliação indireta da concentração de Igs e sólidos totais do colostro administrado para as bezerras COL+ e COL- foi avaliada por meio de colostrômetro e índice Brix, respectivamente. 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- (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios, mínimos e máximos de imunoglobulinas avaliados pelo colostrômetro e Brix para (COL+) e (COL-) – São Paulo – 2016

Parâmetros	Colostrômetro (mg/dL)		p
	COL+	COL-	
Média	9700±1,17	10200±1,20	0,575
Mínimo	8000	7000	
Máximo	12000	12000	
	Brix (%)		0,596
	COL+	COL-	
Média	27,6±3,69	28,5±3,78	
Mínimo	23,0	23,0	
Máximo	32,0	32,0	

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

5.2 STATUS SANITÁRIO

A diarreia foi a doença mais frequente no período neonatal, seguida por inflamações umbilicais e Doença Respiratória Bovina.

A incidência de diarreias foi avaliada a partir da tabulação de dados do

escore de fezes estabelecida segundo McGuirk (2008). A diarreia teve início no D2 e a frequência aumentou do D7 (COL+ = 56%; COL- = 70%) ao D14 (COL+ = 78%; COL- = 60%). Após estes momentos as bezerras apresentaram uma ligeira diminuição na frequência de diarreias no D21 (COL+ = 56%; COL- = 50%) e D28 (COL+ = 44%; COL- = 50%) (Figura 13).

A região umbilical externa foi avaliada através da inspeção e palpação periódica para a detecção de sinais inflamatórios. Desta forma, foi possível detectar que três bezerras do grupo COL- apresentaram inflamação umbilical no D14 (n=2) e D28 (n=1). Além disso, também foram detectadas duas bezerras com broncopneumonia em ambos os grupos: COL+ no D14 (n=1) e COL- no D21 (n=1).

Apesar da maior frequência de doenças encontradas no grupo COL-, não foi possível comprovar diferenças estatísticas entre a frequência de diarreias ou doenças totais usando o teste Qui-Quadrado.

Figura 13 - Frequências (%) do escore fecal em bezerras Holandesas amamentadas com colostro fresco (COL+) e colostro sem células viáveis (COL-) durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

5.2.1 CBT e CCT no colostro

Os valores obtidos para CBT e CCT no colostro fornecido às bezerras COL+ e COL- estão expressos na tabela 2 e figura 14.

Foram obtidos valores médios de $0,94 \times 10^6$ ufc/mL e $3,93 \times 10^6$ ufc/mL para a CBT do colostro fresco e congelado, respectivamente.

Para a CCT observou-se valores de $0,78 \times 10^5$ ufc/mL e $3,01 \times 10^5$ ufc/mL no colostro fresco e congelado, respectivamente.

Não foi possível identificar diferenças entre as contagens bacterianas em relação aos grupos COL+ e COL-.

Tabela 2 - Mediana, mínimo, máximo, média e desvio padrão da CBT/mL ($\times 10^6$ e $\log_{10}$) e CCT/mL ($\times 10^5$ e $\log_{10}$) nas amostras de colostro com (COL+) e sem células (COL-) – São Paulo – 2016

		CBT/mL	$\log_{10}$	CCT/mL	$\log_{10}$
TOTAL DE BEZERRAS (n = 20)	Mediana	$1,0 \times 10^6$	6,02	$0,83 \times 10^5$	4,92
	Mínimo	$0,046 \times 10^6$	4,66	$0,02 \times 10^5$	3,30
	Máximo	$15,0 \times 10^6$	7,19	$22,1 \times 10^5$	6,34
COL +	Mediana	$0,5 \times 10^6$	5,76	$0,63 \times 10^5$	4,80
	Mínimo	$0,076 \times 10^6$	4,88	$0,06 \times 10^5$	3,79
	Máximo	$3,1 \times 10^6$	6,49	$1,81 \times 10^5$	5,26
	Média e DP	$0,94 \times 10^6 \pm 0,92 \times 10^6$	5,98	$0,78 \times 10^5 \pm 0,58 \times 10^5$	4,90
COL -	Mediana	$1,4 \times 10^6$	6,17	$0,99 \times 10^5$	5,00
	Mínimo	$0,046 \times 10^6$	4,66	$0,02 \times 10^5$	3,30
	Máximo	$15,6 \times 10^6$	7,19	$22,1 \times 10^5$	6,34
	Média e DP	$3,93 \times 10^6 \pm 5,14 \times 10^6$	6,60	$3,01 \times 10^5 \pm 6,7 \times 10^5$	5,48
Significância	p		0,215		0,730

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Figura 14 - Contagem bacteriana total (CBT/mL) e contagem de coliformes totais (CCT/mL) nas amostras de colostro com (COL+) e sem células (COL-) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

As amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) foram distribuídas de acordo com a CBT/mL e CCT/mL (Tabela 3).

Em relação à CBT/mL, foram obtidas frequências de 40 e 30; 20 e 10; 20 e 10; 20 e 50% para os intervalos de 0 a 500.000; 500.001 a 1.000.000; 1.000.001 a 1.500.000; e > 1.500.001 nas amostras com (COL+) e sem células viáveis (COL-), respectivamente.

Em relação à CCT/mL, foram obtidas frequências de 50 e 30; 10 e 20; 30 e 30; 10 e 0 e 0 e 20% para os intervalos de 0 a 500.000; 500.001 a 1.000.000; 1.000.001 a 1.500.000; e > 1.500.001 nas amostras com (COL+) e sem células viáveis (COL-), respectivamente.

Tabela 3 - Distribuição das amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) de acordo com a CBT e CCT/mL – São Paulo – 2016

CBT/mL	COL+		COL -		Total	
	%	Nº	%	Nº	%	Nº
0 a 500.000	40	4	30	3	35	7
500.001 a 1.000.000	20	2	10	1	15	3
1.000.001 a 1.500.000	20	2	10	1	15	3
> 1.500.000	20	2	50	5	35	7
Total	100	10	100	10	100	20

CCT/mL	COL+		COL -		Total	
	%	Nº	%	Nº	%	Nº
0 a 50.000	50	5	30	3	40	8
50.001 a 100.000	10	1	20	2	15	3
100.001 a 150.000	30	3	30	3	30	6
150.001 a 200.000	10	1	0	0	5	1
> 200.000	0	0	20	2	10	2
Total	100	10	100	10	100	20

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

5.2.2 Relação entre a CBT / CCT com a concentração de Igs no colostro

Os dados obtidos a partir do colostrômetro e refratômetro Brix para a concentração de IgG foram correlacionados com a contagem bacteriana no colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) (Figuras 15 e 16).

Não foi possível observar correlação entre a CBT/mL ou CCT/mL e a qualidade do colostro avaliada pelo colostrômetro (IgG) ou Brix (sólidos totais). Os valores de P obtidos a partir da correlação podem ser encontrados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de P para a correlação de Pearson em relação às concentrações de IgG e sólidos totais correlacionados com CBT e CCT obtidas a partir das amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016

Parâmetros	CBT			CCT		
	COL+	COL-	TOTAL	COL+	COL-	TOTAL
IgG Colostrômetro (mg/dL)	0,959	0,419	0,651	0,524	0,329	0,369
IgG Brix (%)	0,399	0,319	0,948	0,880	0,159	0,361

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Figura 15 - Correlações entre IgG, contagem bacteriana total (CBT), contagem de coliformes totais (CCT) em amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) - São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Figura 16 - Correlação entre sólidos totais, contagem bacteriana total (CBT), contagem de coliformes totais (CCT) em amostras de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

5.2.3 Isolamento enteropatógenos aeróbios

O cultivo bacteriano das amostras fecais possibilitou a observação de uma vasta variedade de espécies que colonizam o trato gastrointestinal das bezerras Holandesas desde o nascimento até completarem o primeiro mês de vida.

A frequência e o número de gêneros bacterianos isolados a partir das amostras de fezes das bezerras que receberam colostro fresco (COL+) e congelado (COL-), do nascimento aos 28 dias de vida, estão expressos na tabela 5.

Observou-se similaridade entre o número de isolados nas fezes das bezerras COL+ e COL-. O menor número de cepas foi obtido no D0 (COL+=8; COL-=8), e o pico máximo de isolamentos foi observado no D2 para ambos os grupos (COL+=26; COL-=27). Ao final do experimento, o número de isolados diminuiu (COL+=12; COL-=16).

Em ambos os grupos, o momento com menor número de isolamentos foi o D0 com 8 isolamentos. Os gêneros presentes no grupo COL+ foram: Bactéria não fermentativa (25%), *Enterobacter spp* (25%), *Klebsiella spp* (25%), *Citrobacter spp* (12,50%) e *Staphylococcus spp* (12,50%). Os gêneros presentes no mecônio do grupo COL- foram: *Enterobacter spp* (25%), *Klebsiella spp* (25%), *Citrobacter spp* (12,50%), Bactéria não fermentativa (12,50%), *Morganella spp* (12,50%) e *Proteus spp* (12,50%).

No grupo COL+ a bactéria mais isolada foi *Escherichia coli* com 9 isolamentos que correspondem a 45,00% dos isolamentos no D14 e 9 isolamentos de *Proteus spp* que também correspondem a 45,00% no D7.

No grupo COL- a bactéria mais isolada também foi *Escherichia coli*, observou-se 9 isolamentos (52,94%) no D21. Isolou-se 9 cepas de *Proteus spp* (33,33%) no D2 e 9 cepas (47,37%) no D7.

Tabela 5 - Frequências (%) e número de isolamentos por gêneros bacterianos nas amostras de fezes das bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) do nascimento aos 28 dias de vida – São Paulo – 2016

Gêneros	COL+													
	D0		D2		D7		D14		D21		D28		TOTAL	
	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº
Bactéria não fermentativa	25,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	7,69	1	2,83	3
<i>Citrobacter spp</i>	12,50	1	19,23	5	5,00	1	5,00	1	5,26	1	0,00	0	8,49	9
<i>Enterobacter spp</i>	25,00	2	11,54	3	0,00	0	5,00	1	0,00	0	7,69	1	6,60	7
<i>Escherichia spp</i>	0,00	0	19,23	5	25,00	5	45,00	9	36,84	7	30,77	4	28,30	30
<i>Klebsiella spp</i>	25,00	2	15,38	4	0,00	0	10,00	2	15,79	3	7,69	1	11,32	12
<i>Morganella spp</i>	0,00	0	3,85	1	10,00	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	2,83	3
<i>Proteus spp</i>	0,00	0	26,92	7	45,00	9	35,00	7	31,58	6	30,77	4	31,13	33
<i>Pseudomonas spp</i>	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0
<i>Salmonella spp</i>	0,00	0	3,85	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,94	1
<i>Staphylococcus spp</i>	12,50	1	0,00	0	15,00	3	0,00	0	5,26	1	7,69	1	5,66	6
<i>Streptococcus spp</i>	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	5,26	1	0,00	0	0,94	1
Total cepas	100	8	100	26	100	20	100	20	100	19	100	12	100	105

Gêneros	COL -													
	D0		D2		D7		D14		D21		D28		TOTAL	
	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº
Bactéria não fermentativa	12,50	1	0,00	0	0,00	0	5,26	1	5,88	1	18,75	3	5,66	6
<i>Citrobacter spp</i>	12,50	1	11,11	3	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	3,77	4
<i>Enterobacter spp</i>	25,00	2	14,82	4	5,26	1	5,26	1	5,88	1	0,00	0	8,49	9
<i>Escherichia spp</i>	0,00	0	18,52	5	26,32	5	31,59	6	52,94	9	37,50	6	29,25	31
<i>Klebsiella spp</i>	25,00	2	11,11	3	15,79	3	5,26	1	5,88	1	12,50	2	11,32	12
<i>Morganella spp</i>	12,50	1	7,41	2	5,26	1	5,26	1	0,00	0	6,25	1	5,66	6
<i>Proteus spp</i>	12,50	1	33,33	9	47,37	9	42,11	8	17,66	3	18,75	3	31,13	33
<i>Pseudomonas spp</i>	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	5,88	1	6,25	1	1,89	2
<i>Salmonella spp</i>	0,00	0	3,70	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,94	1
<i>Staphylococcus spp</i>	0,00	0	0,00	0	0,00	0	5,26	1	5,88	1	0,00	0	1,89	2
<i>Streptococcus spp</i>	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0
Total cepas	100	8	100	27	100	19	100	19	100	17	100	16	100	106

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

As espécies de bactérias aeróbias mais frequentes isoladas das amostras de fezes das 20 bezerras do nascimento aos 28 dias de vida foram: *Proteus mirabilis* (28,84%), *Escherichia coli* (28,37%), e *Klebsiella pneumoniae* (6,05%) (Tabela 6).

Foi possível observar que as espécies que estiveram em maior frequência nas fezes durante o estudo para o grupo COL+ foram: *Proteus mirabilis* (29,91%), *Escherichia coli* (28,04%), *Citrobacter freundii* (5,61%) e *Staphylococcus spp* (5,61%) (Tabela 6).

As espécies que estiveram em maior frequência nas fezes durante o estudo para o grupo COL- foram: *Escherichia coli* (28,70%), *Proteus mirabilis* (27,78%), *Klebsiella pneumoniae* (11,32%) e *Morganella morganii* (5,66%) (tabela 6).

As diferentes espécies bacterianas isoladas nas fezes das bezerras podem ser observadas na figura 17. Foi possível observar comportamento semelhante entre as espécies para ambos os grupos.

Inicialmente, no D0, foram observadas poucas bactérias quando comparado aos outros momentos (COL+ = 7 e COL- = 8 espécies diferentes). O pico de isolamento ocorreu no D2 (COL+ = 12 e COL- = 10 espécies diferentes). Neste momento foram observadas diversas espécies bacterianas como: *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* no COL+ e *Citrobacter koseri*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella enteridis paratyphila* A no COL-. Nos momentos seguintes houve um decréscimo gradual no número de isolamentos para o grupo COL+ que atingiu o D28 com uma variedade de 6 espécies diferentes isoladas (Bactéria não fermentativa, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus* sp). O COL- apresentou um decréscimo porém menos acentuado no número de isolamentos, finalizando o período também com 6 espécies diferentes (Bactéria não fermentativa, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Tabela 6 - Número de espécies bacterianas e frequência dos isolamentos das amostras de fezes das bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) do nascimento aos 28 dias de vida – São Paulo – 2016

Espécies bacterianas	Total isolados		COL+		COL-	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Bactéria não fermentativa	9	4,19	3	2,80	6	5,56
<i>Citrobacter farmeri</i>	1	0,47	1	0,93	0	0,00
<i>Citrobacter freundii</i>	6	2,79	6	5,61	0	0,00
<i>Citrobacter koseri</i>	6	2,79	2	1,87	4	3,70
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,47	0	0,00	1	0,93
<i>Enterobacter agglomerans</i>	6	2,79	4	3,74	2	1,85
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	2,79	2	1,87	4	3,70
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	0,47	1	0,93	0	0,00
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	0,93	0	0,00	2	1,85
<i>Escherichia coli</i>	61	28,37	30	28,04	31	28,70
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	2	0,93	1	0,93	1	0,93
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0,93	1	0,93	1	0,93
<i>Klebsiella ozaenae</i>	6	2,79	5	4,67	1	0,93
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	6,05	4	3,74	9	8,33
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	1	0,47	1	0,93	0	0,00
<i>Morganella morganii</i>	1	4,19	3	2,80	6	5,56
<i>Proteus mirabilis</i>	9	28,84	32	29,91	30	27,78
<i>Proteus vulgaris</i>	62	3,26	2	1,87	5	4,63
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	0,93	0	0,00	2	1,85
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	0,47	1	0,93	0	0,00
<i>Salmonella enteridis paratyphia A</i>	1	0,47	0	0,00	1	0,93
<i>Staphylococcus</i> sp	8	3,72	6	5,61	2	1,85
<i>Streptococcus</i> sp	1	0,47	1	0,93	0	0,00
TOTAL	214	100	106	100	108	100

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Figura 17 - Comparação entre as diferentes espécies bacterianas isoladas a partir das fezes das bezerras Holandesas (COL+) e (COL-) durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

O comportamento dos principais gêneros bacterianos encontrados para os dois grupos pode ser observado na figura 18.

Klebsiella spp esteve presente em todos os momentos analisados com exceção do D7 para o grupo COL+. Por outro lado, o momento com maior isolamento no COL+ se deu na semana anterior, no D2, com 4 isolamentos. O número máximo de cepas isoladas no grupo COL- ocorreu nos momentos D2 e D7, com 3 isolamentos em cada tempo.

O momento onde mais observa-se *Citrobacter* spp dentre o período analisado foi o D2, pico de COL+ com 5 isolamentos, e pico de COL- com 3 isolamentos. O COL- apenas apresentou isolamento de *Citrobacter* spp nos momentos iniciais D0 e D2, após isso, só foi possível observar para o grupo COL+.

As bactérias não fermentativas estiveram presentes, em maior escala, nos extremos dos momentos analisados. No D0 o grupo COL+ apresentou 2 isolamentos, enquanto o COL- apresentou apenas 1. No D28, o COL+ apresentou 3 isolamentos e o COL- apenas 1 isolado. No D2 e D7 não foi possível isolar esse gênero em ambos os grupos.

Enterobacter spp apresentou-se crescente do D0 ao D2, onde se deu o pico (COL+ = 3 e COL- = 2), em seguida observou-se decréscimo no número de cepas. No D7 e D21 não foram observados isolamentos para o grupo COL+.

O pico de isolamentos da *Morganella* spp no grupo COL+ ocorreu no D7, enquanto o grupo COL- ocorreu no D2, com 2 isolamentos em ambos os grupos. No D21 não foi possível observar nenhum isolamento em ambos os grupos.

O pico de *Staphylococcus* spp ocorreu no D7 para o grupo COL+ com 3 isolamentos. O grupo COL- apresentou apenas dois isolamentos sendo 1 no D14 e outro no D21.

Os isolamentos de *Proteus* spp em ambos os grupos foram crescentes, tendo o pico no dia 7 para COL+ e COL-, obtendo-se 9 isolamentos, seguido de um decréscimo nos momentos subsequentes até alcançar 4 e 3 isolamentos no D28 para os grupos COL+ e COL-, respectivamente (Figura 18).

O perfil de isolamentos para a *Escherichia coli* foi diferente entre os grupos. Observou-se pico de isolamentos para o COL+ no D14, entretanto, o pico no COL- ocorreu no D21.

Figura 18 - Número de isolamentos dos principais gêneros bacterianos isolados nas amostras de fezes das bezerras Holandesas que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Além disso, outros gêneros foram isolados, porém com menor frequência durante o experimento, sendo eles: *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp e *Streptococcus* spp.

As *Pseudomonas* spp não estiveram presentes durante o período estudado para o grupo COL+ e foram isoladas apenas nos momentos D21 e D28 do grupo COL-, obtendo-se 1 isolamento em cada tempo.

A *Salmonella* spp foi isolada duas vezes durante o experimento, uma em cada grupo. Ambos os grupos apresentaram um isolamento de *Salmonella* spp no D2.

O *Streptococcus* spp foi isolado apenas uma vez no grupo COL+, no D21. O grupo COL- não apresentou esse isolamento durante o período estudado.

Para avaliarmos a possível influência das bactérias mais frequentemente isoladas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*) em relação ao tipo de colostro fornecido e frequência de diarreias, foram realizados os testes Qui-Quadrado e Exato de *Fischer*, porém, não foi possível estabelecer nenhum tipo de relação ($P>0,05$).

A primeira associação realizada foi entre bactéria x grupo (COL+/ COL-) onde tentou-se estabelecer associação para verificar se a frequência bacteriana havia sido influenciada pelo tipo de colostro fornecido ($P>0,05$).

A segunda associação estabelecida foi entre a diarreia e a bactéria para avaliar se a diarreia (ausente/presente) influenciou na frequência das bactérias mais frequentemente encontradas ($P>0,05$).

6 DISCUSSÃO

O colostro bovino possui múltiplas funções, além daquelas relacionadas à transferência de fatores imunes aos recém-nascidos. Esta pesquisa comprovou que o colostro tem potencial para carrear inúmeras bactérias aos recém-nascidos, que podem ter interferido diretamente na colonização do trato gastrointestinal, bem como influenciado no *status* de saúde das bezerras que desenvolveram episódios importantes de diarreia, os quais serão discutidos a seguir. Entretanto, a presença de células no colostro não influenciou na colonização do intestino por bactérias aeróbias isoladas a partir das fezes.

6.1 QUALIDADE DO COLOSTRO

A celularidade do colostro fornecido às bezerras deste experimento foi avaliada apenas no grupo COL+ para leucócitos totais, pois o congelamento do colostro fornecido ao grupo COL- promoveu a lise das células. 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 células viáveis. Desta forma, 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 bezerras recém-nascidas.

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

A ausência de diferenças estatísticas 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.

6.2 STATUS SANITÁRIO

A frequência da diarreia observada neste estudo foi maior no COL+ (44-78%) e COL- (50-70%) do que a prevalência (19,1%) e índice de risco (21,2%) reportados por outros pesquisadores (BARTELS et al., 2010; WINDEYER et al., 2014). Na fazenda onde este experimento foi desenvolvido, as mães foram vacinadas no período pré parto para *Escherichia coli*, Rotavirus e Coronavírus. Assim, a diarreia encontrada neste experimento deveria ser menor do que a real incidência da propriedade. Megank et al. (2015) provaram que a vacinação das mães reduziu a frequência de diarreia de 39,9% para 14,3% em bezerros recém-nascidos.

A frequência das diarreias foi similar entre os grupos, entretanto apenas o grupo COL- apresentou inflamações umbilicais (n=3). Foram detectadas duas bezerras com broncopneumonia, uma pertencente a cada grupo. Langel et al. (2015) avaliaram a saúde das bezerras que receberam colostro fresco e congelado usando escores de fezes e escores respiratórios. Estes autores também não encontraram diferenças estatísticas para a frequência de diarreia entre os grupos, entretanto o escore respiratório foi maior no grupo COL- no D38. Nossos achados de broncopneumonia não eram esperados pela faixa etária em que as bezerras se encontravam, pois, inicialmente a bezerra está protegida pelos anticorpos maternos adquiridos pelo colostro (RIDIPATH; BOLIN, 1995); entretanto, a metabolização destes componentes e a diminuição da sua concentração no plasma são fatores predisponentes para a instauração de quadros clínicos, como os respiratórios, a partir do primeiro mês de vida (BABIUK et al., 2004).

6.2.1 CBT e CCT no colostro

Foram obtidos valores médios de $0,94 \times 10^6$ ufc/mL (Log_{10} : 5,98) e $3,93 \times 10^6$ ufc/mL (Log_{10} : 6,60) para a CBT do colostro fresco e congelado, respectivamente. Para a CCT observou-se valores de $0,78 \times 10^5$ ufc/mL (Log_{10} : 4,90) e $3,01 \times 10^5$ ufc/mL (Log_{10} : 5,48) no colostro fresco e congelado, respectivamente. Considerando a CBT e CCT do colostro congelado pode-se afirmar que a maioria das bactérias eram coliformes fecais; sendo assim, pressupõe-se que a maior contagem bacteriana total destes grupos pode estar associada à contaminação entre a colheita e o fornecimento do colostro às bezerras.

Godden et al. (2012), obtiveram valores inferiores de CBT ($3,5 \log_{10}$ CBT/mL) e valor superior para a CCT ($5,6 \log_{10}$ CCT/mL) em amostras de colostro fresco, quando comparadas aos valores obtidos neste experimento. As diferenças nos valores, apesar de não terem sido muito discrepantes, podem ter se dado por importantes fatores de risco para a contaminação do colostro, desde a ordenha até a coleta das amostras frescas, levando-se em consideração os seguintes itens: identificação e separação de vacas infectadas; impedimento da bezerra de mamar diretamente da mãe; preparação da higiene da glândula mamária antes e após a ordenha; higienização do equipamento de ordenha; armazenamento e limpeza dos equipamentos de alimentação, além da influência do local, pois um experimento foi realizado no Brasil, com suas condições climáticas e o trabalho em questão foi realizado em Minnesota, EUA, o que pode ter influenciado na diferente carga bacteriana das amostras do colostro.

Apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas entre os grupos de bezerras que ingeriram colostro fresco (COL+) e congelado (COL-), tanto a mediana quanto a média da CBT e CCT foram superiores no grupo que ingeriu colostro congelado. Este resultado não seria inicialmente esperado, caso considerássemos que a amostra de colostro fornecida às bezerras COL- tivesse sido congelada imediatamente após ter sido ordenhada e envazada. Infelizmente isto não ocorreu conforme o planejado, pois este estudo foi realizado em fazenda comercial e não havia a possibilidade de interferir diretamente no manejo e protocolo de colostragem da propriedade.

O colostro é mantido em geladeira 24 horas antes do seu congelamento, aguardando caso alguma bezerra necessite tomá-lo. Caso não seja necessário o fornecimento deste colostro, a mesma garrafa é retirada da geladeira e armazenada no freezer, onde fica congelado até o momento em que precisar descongelar para fornecer a alguma bezerra ou, no caso do experimento, para fornecer ao grupo COL-. É interessante ressaltar que este manejo, que tem ótima intenção por parte da fazenda, que tenta prezar pela viabilidade dos leucócitos colostrais ao mantê-los refrigerados e não congelados, não é o ideal, pois estudos prévios da nossa equipe comprovaram que a viabilidade celular dos colostros armazenados em geladeira se mantém estável até 6 horas após ordenha; depois disso a viabilidade diminui consideravelmente (NOVO et al., 2014).

O tempo de permanência do colostro na geladeira por 24 horas, provavelmente viabilizou este aumento na proliferação das bactérias psicrótróficas das amostras, aquelas que apresentam ótima taxa de crescimento em temperaturas abaixo de 7°C (FRANK et al., 1992).

As maiores frequências obtidas para a CBT no colostro fresco foram de 40% para o menor intervalo (0 e 500.000 ufc/mL) e 50% para o maior intervalo (> 1.500.000) no colostro congelado.

Apenas duas amostras estiveram dentro dos valores recomendados como meta por McGuirk e Collins (2004) para a contagem bacteriana total (<100.000 ufc/mL). Isso quer dizer que 10% de todo o colostro fornecido estava dentro do limiar de bactérias totais preconizado pelos autores e aceito por grande parte de outros pesquisadores da literatura.

Para a CCT também observou-se maior frequência das amostras no menor intervalo (0 a 50.000 ufc/mL) para o colostro fresco (50%). As maiores frequências para o colostro congelado foram encontradas nos intervalos de 0 a 50.000 (30%) e 100.001 a 150.000 ufc/mL (30%).

Apenas três amostras estiveram dentro dos valores recomendados para CCT por McGuirk e Collins (2004) (<10.000 ufc/mL). Destas, duas amostras eram pertencentes ao COL- e uma ao COL+. O fato de 17/20 amostras estarem acima dos índices mundialmente aceitos por outros pesquisadores da área, nos faz pensar em duas questões: a primeira delas é a qualidade higiênica do colostro que se é fornecido às bezerras e no manejo que se é realizado com o colostro desde a ordenha até o fornecimento ao animal, uma vez que neste intervalo ocorre a

proliferação de bactérias; a outra questão a ser considerada é se estes valores preconizados por McGuirk e Collins (2004) e aceitos por outros pesquisadores, não seriam um tanto quanto baixos e utópicos ao considerar a realidade ambiental e da rotina da fazenda.

Outro ponto importante a ser considerado é a possibilidade de alguns grupos bacterianos presentes no colostro serem em parte positivos para o desenvolvimento do hospedeiro ao invés de patogênicos, como por exemplo os *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, que são grupos bacterianos isolados do colostro e leite materno humano e comumente utilizados como probióticos. Estas bactérias são importantes para o crescimento saudável do hospedeiro, pois em estudos humanos, comprovaram que elas atuam inibindo o crescimento e atividades de bactérias patogênicas no lúmen do intestino e em bovinos neonatos são responsáveis por maior ganho de peso e menor índice de diarreia (ABE; ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1995; ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004).

Os valores de imunoglobulinas obtidos a partir do colostrômetro e refratômetro Brix para a concentração de IgG foram correlacionados com as bactérias do colostro (CBT e CCT), porém não foram encontradas correlações. Todas as bezerras deste experimento foram colostradas com colostro de alta qualidade e a transferência de imunidade passiva destes animais foi confirmada através da mensuração da proteína total do soro das bezerras por Blima (2015).

Pesquisadores têm avaliado a contagem bacteriana em comparação não só ao colostro fresco e congelado, mas também ao colostro pasteurizado, como importante minimizador da carga bacteriana (GODDEN et al., 2012). Dentro do contexto apresentado e da alta presença de bactérias no colostro congelado, apesar de não podermos afirmar se elas eram patogênicas ou benéficas para a microbiota, pode-se recomendar o uso de pasteurizador de colostro para melhorar o manejo desta fazenda e minimizar a CCT, pois, mesmo considerando todo o cuidado e higiene no atual protocolo de manejo, ainda assim não é suficiente para manter os níveis de bactérias na amostra próximos aos valores recomendados. Ao pasteurizar o colostro a 60°C por 60 minutos, Godden et al. (2012) notaram que não houve alteração na concentração de IgG do colostro e diminuiu riscos de doenças até o desmame, minimizando índices de morbidade e mortalidade, porém, mencionaram um ponto negativo que seria a diminuição da viabilidade de leucócitos colostrais.

Além disso, ressalta-se a perda das bactérias benéficas *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

Outros autores também demonstraram que a pasteurização foi bastante eficaz ao atingir o objetivo de redução de CBT e CCT do colostro (JOHNSON et al., 2007; ELIZONODO-SALAZAR; HEINRICHS, 2009).

O ideal seria o fornecimento de colostro fresco, pelo menos na primeira mamada, com baixas CBT e CCT para garantir a viabilidade das células do colostro e bactérias benéficas. A pasteurização seria uma boa alternativa considerando rebanhos com altas taxas de mastite no pós-parto imediato, que resulta na falta de volume adequado de colostro para amamentar as bezerras no primeiro dia de vida. Recomenda-se que o colostro pasteurizado seja fornecido apenas na segunda mamada de colostro. Outra questão a ser considerada é o custo do pasteurizador, por volta de U\$33.000 com capacidade para 100 litros.

6.2.2 Isolamentos bacterianos das fezes

O cultivo bacteriano das amostras fecais nos possibilitou acompanhar a dinâmica bacteriana das bezerras durante o primeiro mês de vida.

A maioria das bezerras ao nascimento apresentaram pouco crescimento bacteriano no mecônio. Há quem acredite que o útero é um ambiente completamente estéril (BARRINGTON; PARISH, 2001), mas sabe-se que nem sempre é assim que ocorre (NOAKES; WALLACE; SMITH, 1991). Hoje em dia existem técnicas de biologia molecular capazes de determinar a microbiota residente dos tecidos, como do útero por exemplo. Desta forma, a observação de algumas bactérias no mecônio foi um resultado esperado.

Após a colostragem, exame clínico e cura de umbigo, os animais foram transferidos da baia de dentro da maternidade para as baias de madeira no chão, no ambiente externo da maternidade, no bezerreiro. O pico de isolamento observado nesta pesquisa ocorreu no D2 (COL+= 12 e COL-= 10 espécies diferentes); próxima coleta após os animais terem sido transferidos de lugar. Neste momento foram observadas diversas espécies bacterianas dos gêneros: *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Morganella* spp, *Proteus* spp *Salmonella* spp e

Escherichia coli, no COL+. No COL- os gêneros bacterianos isolados foram: *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Morganella* spp, *Proteus* spp e *Salmonella* spp e *Escherichia coli* no COL-.

Ao analisarmos as bactérias isoladas neste momento, pode-se observar uma grande quantidade de bactérias próprias da microbiota, aquelas chamadas de residentes, como as pertencentes aos gêneros *Enterobacter* spp e *Klebsiella* spp. Estas bactérias são consideradas próprias da microbiota pois são encontradas em fezes de animais com e sem diarreia (RIBEIRO et al., 2000).

A *Salmonella* spp e *Escherichia coli* encontradas em ambos os grupos são conhecidas por serem grandes responsáveis pela diarreia neonatal bovina. O mecanismo de virulência principal da *Salmonella* spp consiste na capacidade de invadir a mucosa intestinal, se multiplicar em tecidos linfoides e evadir do sistema de defesa do organismo. A diarreia por *Salmonella* spp pode se apresentar de forma aquosa, mucoide e com presença de estrias de sangue. A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é a principal bactéria relacionada à diarreia neonatal bovina, que produz K99, antígeno de adesão. A ETEC afeta o epitélio intestinal e se multiplica nos enterócitos das vilosidades do intestino. A região de predileção da ETEC é a porção distal do intestino delgado devido ao baixo pH da região (ACRES et al., 1985; FRANCIS et al., 1989; NATARO; KAPER, 1998; CHO; YOON, 2014; SEEDY et al., 2016).

Este alto número de isolamentos está relacionado a diversos fatores epidemiológicos como: alteração de ambiente; mudanças climáticas; aumento da densidade populacional; maior contato com funcionários da fazenda; manejo ao qual os animais foram submetidos, que se tornam desafios para o animal jovem (FERREIRA et al., 2009). As bezerras do experimento foram alocadas nesta baia de madeira no chão (D2), onde há pouca ventilação, pouca entrada de luz, e principalmente é de difícil higienização, sendo que o ideal seria a realização de vassoura de fogo com frequência; porém, a fazenda acabava higienizando com cal virgem e água. Este fato pode ter influenciado no aumento da presença da diarreia encontrado neste experimento.

No grupo COL+ (D14 = 45%) e COL- (D21= 52,9%) a bactéria mais isolada foi *Escherichia coli*. Os momentos deste experimento em que foram isoladas *E. coli* em alta quantidade diferem do achado de Rada et al. (2006) que relataram maior frequência da população bacteriana em questão no terceiro dia, observando-se

diminuição acentuada até o sétimo dia. Os valores obtidos a partir de então oscilaram pouco, apresentando leve aumento do D7 ao D21.

Rada et al. (2006) relacionaram o isolamento de *Escherichia coli* com os isolamentos de bifidobactéria. No dia 3, quando a população de *E. coli* esteve em alta, a de bifidobactéria estava baixa. Logo em seguida, a população de bifidobactéria aumentou, enquanto a de *E. coli* diminuiu, apresentando inversão nos valores. Essa inversão acentuada de população bacteriana foi justificada pelos autores por possível alteração na alimentação, uma vez que a bifidobactéria é considerada um excelente probiótico que possivelmente competiu por espaço com a *Escherichia coli*, utilizando-se de mecanismos antibacterianos como, por exemplo, a diminuição do pH gastrintestinal pela produção de compostos ácidos que inibem o crescimento de patógenos e inibe a aderência de *Escherichia coli* aos receptores por mecanismo de competição, mecanismos estes que minimizam o potencial inflamatório dos enteropatógenos (BRANDT; CARNEIRO SAMPAIO; MIUKI, 2006; MARTIN et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013).

O gênero *Proteus* spp que foi o segundo gênero mais isolado neste experimento, após a *Escherichia coli*, não esteve associado à diarreia pelo teste de Qui-Quadrado. Oliveira Filho (2006) também isolou *Proteus* spp nas amostras de fezes de bezerros sadios e diarreicos, concluindo que ela não tem relação direta com a diarreia e faz parte da microbiota residente.

Citrobacter spp foi outro gênero comumente encontrado durante todo o experimento para o grupo COL+ com exceção do D28. O momento em que essa bactéria foi mais isolada foi no D2, com 19,23% dos isolamentos. Por outro lado, esse gênero no grupo COL- foi encontrado apenas no início do experimento no D0 e D2 (12,50 e 11,11%). O gênero *Citrobacter* spp não está diretamente associado com a diarreia pois autores relacionam o gênero com a flora normal do trato gastrintestinal, porém, em grande quantidade pode ter um possível papel patogênico (RIBEIRO et al., 2000).

Os principais patógenos causadores de diarreias em bezerros neonatos são *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* spp e viroses representadas por Rotavírus e Coronavírus, respectivamente, encontrados antes e após a primeira semana de vida (FEITOSA et al., 2008; GULLIKSEN et al., 2009; BARTELS et al., 2010). A natureza multifatorial da diarreia em bezerros (bactérias, vírus e protozoários) torna esta

doença difícil de controlar com eficácia. Além disso, em muitos casos, as diarreias vêm acompanhadas de outras doenças concomitantes (CHO; YOON, 2014).

Apesar de considerarmos as bactérias como possíveis principais agentes causadores da diarreia, o que observamos foi que provavelmente outros agentes que não apenas os bacterianos, estiveram à ela relacionados. Estes dados fazem com que se possa concluir que a diarreia apresentada pelas bezerras deste experimento não tenha sido causada necessariamente pelas bactérias que foram isoladas. Estas bactérias podem, em sua maioria, ser apenas microrganismos pertencentes à microbiota residente.

As bactérias tradicionalmente identificadas e classificadas utilizando técnicas de cultura e provas bioquímicas como as desenvolvidas neste trabalho, requerem um processo bastante demorado e trabalhoso. Muitas bactérias não são fáceis de cultivar e isolar, principalmente as anaeróbias. O período de cultura pode variar, dependendo da bactéria e do material utilizado para o isolamento, fazendo com que o tempo de leitura e resultado sejam variados (ELKJAER et al., 2013).

Embora as técnicas de cultura bacteriana tenham auxiliado na identificação dos microrganismos, estudos utilizando essas técnicas podem subestimar a quantidade dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal de bovinos (SANTOS et al., 2011; PENGE et al., 2013). Desta forma, em 1996 foi desenvolvido o pirosequenciamento por Ronaghi e colaboradores que permitiu o sequenciamento genético via extração de DNA bacteriano e rDNA ribossomal auxiliando na compreensão e caracterização mais completa do microbioma (WANG et al., 2012; AZIZ et al., 2013; KNUDSEN et al., 2014; VAZIRI et al., 2015).

Como consequência do desenvolvimento e difusão das técnicas de sequenciamento e estudos em metagenômica, aumentou consideravelmente o número de trabalhos relacionados ao microbioma humano e animal. Entre os vários ambientes animais explorados através da metagenômica, o trato gastrointestinal bovino e o reprodutivo são os mais estudados, no entanto as pesquisas ainda estão apenas começando (KNUDSEN et al., 2014).

Estes métodos apresentam vantagens em comparação à técnica de cultura bacteriana tradicional, uma vez que são capazes de detectar o DNA bacteriano e indicar todas as bactérias presentes na amostra. Esta técnica não depende do potencial de crescimento bacteriano e detecta todas as bactérias, não apenas as que podem ser cultivadas. No entanto, apesar de todas essas vantagens, os custos

por amostra ainda são muito elevados, limitando o uso desse método (ELKJAER et al., 2013). As amostras deste experimento estão armazenadas em freezer -80°C para futuro sequenciamento metagenômico pois, após o início deste experimento, foi aprovada a verba para fazermos a análise do DNA bacteriano. Em breve, estes resultados trarão mais respostas aos nossos questionamentos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir:

- (a) Os colostros celular e acelular apresentavam a mesma concentração de imunoglobulinas, contagem bacteriana total e contagem de coliformes;
- (b) A administração de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) não influenciou na proporção de bactérias aeróbias presentes nas fezes das bezerras durante o período neonatal;
- (c) A administração de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) não influenciou na ocorrência de diarreias em bezerras durante o período neonatal.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets, **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2838-2846, 1995.
- ACRES, S. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review, **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 229—256, 1985.
- ADKINS, M. L. Ecology of transferred maternal Staphylococci and neonatal Staphylococcal immunity. In: SCIENCE OF VETERINARY MEDICINE SYMPOSIUM, 2014, Georgia: University of Georgia, 2014.
- AZIZ, Q.; DORE, J.; EMMANUEL, A.; GUARNE, F.; QUIGLEY, E. M. M. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions, **Neurogastroenterology Motility**, v.25, p.4-15, 2013.
- BABIUK, S.; BACA-ESTRADA, M. E.; FOLDVARI, M.; MIDDLETON, D. M.; RABUSSAY, D.; WIDERA, G.; BABIUK, L. A. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 1-10, 2004.
- 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 in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 162–169, 2010.
- BLIMA, S. **Avaliação de métodos para estimar a qualidade do colostro bovino e sua relação com os teores de imunoglobulinas transferidas aos recém-nascidos**. São Paulo: [s. n.], 2015. Programa de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo.
- BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. Revisões e Ensaio: **Pediatria**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-127, 2006.
- 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.
- CHO, YONG-IL.; YOON, KYOUNG-JIN. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal Veterinary Science**, v. 15 n.1, p. 1-17, 2013.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. R. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

EDWARDS, P. R.; EWING, W. H. Identification of enterobacteriaceae. Minneapolis: **Burgess Publication**. 3th edition, p. 85-90, 1972.

ELIZONDO-SALAZAR, J. A.; HEINRICHS, A. J. Feeding heat-treated colostrum or unheated colostrum with two different bacterial concentrations to neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.92, n. 9, p. 4565-4571, 2009.

ELKJAER, K.; ANCKER, M. L.; GUSTAFSSON, H.; FRIGGENS, N. C.; WALDMANN, A.; MOLBAK, L.; CALLESEN, H. Uterine bacterial flora in postpartum Danish Holstein dairy cows determined using DNA-based fingerprinting: correlation to uterine condition and calving management. **Animal reproduction science**, v.138, n. 1, p. 39-48, 2013.

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; FÉRES, F. C.; BOVINO, F.; PERRI, S. H. V.; MEIRELES, M. V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28 n. 10, p. 452-456, 2008.

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.

FERREIRA, M. G.; FACURY FILHO, E. J.; HEINEMANN, M. B.; CARVALHO, A. Ú.; LAGE, A. Ú.; FERREIRA, P. M.; FREITAS, M. D. Prevalência de *Eimeria*, *Helmintos*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Rotavirus*, *Coronavirus* e *Cryptosporidium parvum* em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil. **Ciência animal Brasileira**, v. 1, p.524-529, 2009.

FRANCIS, D. H.; ALLEN, S. D.; WHITE, R.D. Influence of bovine intestinal fluid on the expression of K99 pili by *Escherichia coli*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 822-826, 1989.

FRANK, J. F. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington: **American Public Health Association**, p.271-286, 1992.

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

GODDEN, S. M.; SMOLENSKI, D. J.; DONAHUE, M.; OAKES, J. M.; BEY, R.; WELLS, S.; SREEVATSAN, S.; STABEL, J.; FETROW, J. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 4029-4040, 2012.

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.

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.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 2, p.299-313, 2004.

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3561–3573, 2004.

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

KNUDSEN, L. R. V.; SCHOU, K. K.; JENSEN, T. K.; ANGEN, O. Molecular characterisation of the uterine microbiome of dairy cows suffering from endometritis, metritis and pyometra. Kgs. **Lyngby: Technical University of Denmark**, 2014

KRIEG, N. R., HOLT, J.C. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9. Ed. Baltimore: **Willians & Wilkings**, p. 1599, 1984.

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.

MARTIN, R.; JIMÉNEZ, E.; HEILIG, H.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; ZOETENDAL, E. G.; RODRIGUEZ, J. M. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 965- 969, 2009.

MARTIN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, ML.; XAUS, J.; RODRIGUEZ, J. M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **Journal of Pediatrics**, V. 28, p. 36-44, 2012.

MCGUIRE M. K.; MCGUIRE M. A. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? **American Society for Nutrition**, v.6, p. 112–123, 2015.

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., AND M. COLLINS. Managing the production, storage and delivery of colostrum, **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p. 593-603, 2004.

MEGANCK, V.; OPSOMER, G.; PIEPERS, S.; COX, E.; GODDEERIS, B. M. Maternal colostral leukocytes appear to enhance cell-mediated recall response, but inhibit humoral recall response in prime–boost vaccinated calves. **Journal of Reproductive Immunology**, 2015. DOI: /dx.doi.org/doi:10.1016/j.jri.2015.11.004

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 142-201, 1998.

NOAKES D. E.; WALLACE, L.; SMITH, G.R. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms, *Veterinary Record*, v. 128, n. 19, p. 440-442, 1991.

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.

OLIVEIRA FILHO, J. P. **Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clinic e etiológico**. 2006. 109 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

PENGE, Y.; WANG, Y.; HANG, S.; ZHU, W. Microbial diversity in uterus of healthy and metritic postpartum Holstein dairy cows. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 593-600, 2013.

POULSEN, K. P.; MCGUIRK, S. M. Respirator y disease of 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.

RADA, V.; VLOKOVÁ, E.; NEVORAL, J.; TROJANOVÁ, I. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. **Microbiology Letters**, v. 258, p. 25-28, 2006.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; JEREZ, J. A.; LEITE, D. S.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.2, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962000000200004>

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotypes: detection of a large genomic insertion in a nonpathogenic BVDV. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 39-46, 1995.

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.

SANTOS, T. M. A.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 1, p. 291-302, 2011.

SEEDY, F. R.; ABED, A. H.; YANNI, H. A.; RAHMAN, S. S. A. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.

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.

VAZIRI, N. D.; ZHAO, Y. Y.; PAHL, M. V. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. **Nephrology Dialysis transplantation**, p. 1-10, 2015.

VLKOVÁ, E.; TROJANOVÁ, I.; RADA, V. Distribution of Bifidobacteria in the gastrointestinal tract of cows. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 4, p. 325-328, 2006.

WANG, S.; ZHU, H.; LU, C.; KANG Z.; LUO, Y.; FENG, L.; LU, X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 4813-4822, 2012.

WINDEYER, M. C.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S. M.; HODGINS, D. C.; LISSEMORE, K. D.; LEBLANC, S. J. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, n.2, p. 231-240, 2013.

**CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DOS LEUCÓCITOS DO COLOSTRO NA RESPOSTA
IMUNE INATA DE BEZERRAS HOLANDESAS RECÉM-
NASCIDAS**

8 INTRODUÇÃO

Os bezerros recém-nascidos nascem imaturos e agamaglobulinêmicos, devido à impermeabilidade da placenta sinepteliocorial dos bovinos, cuja principal função é a proteção do ambiente fetal contra microrganismos patogênicos. Desta forma, os animais emergem do útero e iniciam a sua vida mediante à exposição aos inúmeros microrganismos do meio ambiente ao qual está inserido (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

A imunossupressão é outro evento associado ao estresse materno-fetal que possui impacto no status imune dos recém-nascidos, devido ao aumento no cortisol principalmente quando o parto é distócico (VANNUCCHI et al., 2015). O efeito do cortisol sob o perfil leucocitário é classicamente relatado nos primeiros três dias de vida, caracterizado por leucocitose, neutrofilia, monocitose, linfopenia e eosinopenia. Assim, pode-se afirmar que bezerros recém-nascidos apresentam predomínio de neutrófilos e baixos valores de linfócitos ao nascimento, observando-se inversão deste perfil a partir do terceiro dia de vida (BENESI et al., 2012; NOVO et al., 2015). O cortisol estimula a liberação de neutrófilos segmentados e bastonetes pela medula óssea do compartimento estoque para a circulação (TORNQUIST; RIGAS, 2010).

O *status* imune do recém-nascido ao nascimento o torna dependente do colostro materno. Falhas no gerenciamento do manejo do colostro na criação de bezerras estão associadas à elevada prevalência (19,1%) e incidência (21,2%) de diarreia neonatal causada por *Escherichia coli*, Rotavírus, Coronavírus e *Cryptosporidium parvum* (WINDEYER et al., 2013; MEGANCK; HOFLACK; OPSOMER, 2014). Além disso, animais que receberam colostro com baixos teores de imunoglobulinas apresentaram altos índices de escore de diarreia que perduraram por mais tempo, alta mortalidade e menor ganho de peso, quando comparados à animais que receberam colostro com alto teor de imunoglobulinas (NOCEK; BRAUND; WARNER, 1984).

O colostro contém altas concentrações de nutrientes e hormônios que dão suporte ao crescimento e maturação no desenvolvimento fisiológico do bezerro. O colostro também contém fatores imunológicos importantes como citocinas, anticorpos e uma grande quantidade de leucócitos maternos para a proteção do neonato. O papel dos anticorpos colostrais na proteção do neonato tem sido bem

estabelecido, entretanto, o papel dos leucócitos maternos e citocinas do colostro ainda não foi completamente estabelecido.

O colostro bovino contém entre 1×10^6 e $2,5 \times 10^6$ células somáticas/mL, dentre as quais cerca de 32% são viáveis (MCDONALD; ANDERSON, 1981; LIEBLER-TENORIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002; GOMES et al., 2011; SILVA, 2014). A população de leucócitos no colostro de primeira ordenha consiste em 13,3% de neutrófilos, 16,4% de linfócitos, 69,5% de monócitos e células epiteliais e 0,27% de eosinófilos (GOMES et al., 2011). Meganck et al. (2014) avaliaram a proporção dos leucócitos colostrais e obtiveram 25,4% de linfócitos T, 2,9% de linfócitos B, e 32,7% de macrófagos.

As células do colostro bovino são absorvidas pelo epitélio intestinal dos recém-nascidos e migram para a placa de *Peyer* e linfonodos mesentéricos (LIEBLER-TENORIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002). As células maternas também foram encontradas na circulação sanguínea dos recém-nascidos, detectando-se pico máximo de observação 24 horas após a ingestão do colostro. Em seguida, as células maternas desapareceram da circulação sanguínea com 36 horas devido à migração das mesmas para outros tecidos e órgãos linfoides secundários com intuito de promover proteção ao recém-nascido (REBER et al., 2006).

O perfil imune dos bezerros após a ingestão de colostro celular e acelular parece ser diferenciado, de acordo com os resultados obtidos nas poucas pesquisas realizadas nesta área. Além disso, a maioria dos dados refere-se à avaliação do perfil imune específico e pouco se sabe sobre o padrão da resposta imune inata em bezerros que ingeriram colostro fresco ou congelado.

Riedel-Caspari (1993) infectou 20 bezerras com 10^9 colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica, através de inoculação oral, três horas após o nascimento e antes do fornecimento de colostro. Após a inoculação, as bezerras foram alimentadas com colostro com e sem células. A autora observou que as células do colostro podem desempenhar papel importante na manutenção de saúde do bezerro, uma vez que as bezerras que receberam colostro com células apresentaram maior vitalidade durante o período estudado. Os animais que receberam colostro sem células apresentaram maior temperatura retal, principalmente entre os dias 9 e 16, do que o COL+. Nitidamente estes animais apresentaram maior carga de *E. coli*. Além disso, alguns animais do COL- se

recusaram a ingerir o substituto de leite que foi oferecido igualmente para ambos os grupos, enquanto todos os animais do COL+ o ingeriram normalmente. O grupo COL+ excretou menos *E. coli* durante a primeira semana de infecção e apresentou pico de excreção depois do COL-. O COL+ atingiu o limite inferior de detecção de bactérias mais cedo em relação ao COL-, que por sua vez apresentou outro pico de detecção após o COL+ já ter cessado a liberação nas fezes. Os animais do COL- atingiram o limite mínimo de detecção quatro dias após o COL+. Em relação às concentrações específicas de anticorpos (IgA e IgM), os autores observaram que a concentração foi maior no soro das bezerras COL+ durante todo o período analisado. A autora conclui que leucócitos colostrais aumentaram a resistência dos animais contra a infecção artificial desde o início, sinalizando para uma menor resposta inflamatória do grupo, e que essas células contribuem para a imunidade passiva e a resistência do recém-nascido, ressaltando que a qualidade e quantidade de leucócitos são cruciais para a sua eficiência. Por outro lado, Langel et al. (2015) não encontraram diferenças para os escores de diarreia em bezerras que receberam colostro fresco e congelado.

Bezerros que mamaram colostro acelular apresentaram maior expressão dos receptores CD11a, CD11c, CD43 e CD62L nas células mononucleares, em comparação aos bezerros que receberam colostro celular, indicando maior ocorrência de processos inflamatórios. O CD11a e CD43 são importantes receptores ligados à migração celular da corrente sanguínea para o epitélio intestinal e o CD62L está relacionado à sinalização dos leucócitos para que eles diminuam a velocidade de circulação e fiquem aderidos à parede dos vasos sanguíneos facilitando a adesão e migração (REBER et al., 2006). Em contrapartida, Stieler et al. (2012) não observaram diferenças na proporção ou índice de fagocitose de neutrófilos e macrófagos entre os bezerros que receberam colostro fresco e congelado.

A hipótese desta pesquisa é de que as células do colostro bovino influenciam na resposta imune inata e consequentemente no perfil sanitário de bezerras Holandesas durante o primeiro mês de vida. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se o fornecimento de colostro com (fresco) e sem células viáveis (congelado) influencia na proporção e função dos neutrófilos sanguíneos e ocorrência de doença durante o período neonatal.

9 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº2934/2013.

9.1 BEZERRAS

As bezerras desta pesquisa eram oriundas de fazenda comercial de alta produção, localizada no município de Araras – São Paulo. Este experimento foi conduzido de julho a outubro de 2014.

Os partos foram assistidos pelos funcionários e veterinários da propriedade para auxílio obstétrico, separação das recém-nascidas e controle do manejo de colostro (Figura 19).

A equipe de pesquisa era acionada assim que os funcionários detectavam o início do trabalho de parto para o deslocamento de pessoal e preparo do material para a colheita das amostras.

Figura 19 - Nascimento em baias de parição (a); colostragem em baias de transição (b), localizadas na maternidade – São Paulo – 2016

(a)

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

(b)

Bezerras híidas advindas de partos eutócicos foram selecionadas por meio do exame clínico geral, segundo os procedimentos descritos por Dirksen et al.

(2008). Foram aferidas as frequências cardíaca (FC), respiratória (FR) e temperatura corpórea (Quadro 5). Outros critérios foram usados para determinar a vitalidade das bezerras, tais como: tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração das mucosas oculares (RODRIGUES, 2008).

Quadro 5 - Intervalos de referência para as funções vitais em bezerras no primeiro mês de vida

Parâmetros	Intervalos de Referência				
	1 hora após nascimento	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
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

Fonte: (SILVA et al., 2016, no prelo)⁴

Vinte bezerras híidas foram triadas e distribuídas em dois grupos denominados COL+ (n=10) e COL- (n=10). As bezerras do grupo COL+ receberam colostro fresco com células proveniente de suas respectivas mães, enquanto os animais COL- receberam colostro congelado sem células viáveis oriundo de vacas doadoras.

Vacas e doadoras foram ordenhadas imediatamente após a parição em tronco de contenção localizado no interior da maternidade. Inicialmente foi realizada a lavagem com solução clorada e secagem dos tetos com papel toalha individual.

O colostro das doadoras foi armazenado pelos funcionários da fazenda em garrafas plásticas de 2L, mantidas sob refrigeração (4 - 8°C), por 24 horas. Por fim, as garrafas foram estocadas a -20°C durante o período mínimo de 24 horas e máximo de 3 meses.

Inicialmente, para justificar a ausência de leucócitos viáveis nas amostras congeladas, foi realizado um projeto piloto pela equipe onde alíquotas de colostro fresco, refrigerado e congelado foram avaliadas quanto à sua viabilidade celular, de hora em hora, durante as primeiras seis horas e, após, entre 18-24 horas. Com esse estudo foi possível comprovar que as amostras de colostro que foram congeladas

⁴ SILVA, B. T.; HENKLEN, A.; MARQUES, R. S.; OLIVEIRA, P. ;L.; LEITE, S. B. P.; NOVO, S. M. F.; BACCILI, C. C.; REIS, J. F.; GOMES, V. Vital parameters of Holstein calves from birth to weaning. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. [200-]. (no prelo).

não apresentaram viabilidade celular após o congelamento (0%) desde os momentos iniciais (NOVO et al., 2014).

A avaliação indireta da concentração de Igs do colostro administrado para as bezerras COL+ e COL- foi avaliada por meio de colostrômetro e refratômetro Brix (23-32%). 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-.

A quantidade de células somáticas (1,9 milhões/mL; $\log_{10}$: 6,28) encontrada no colostro foi estimada a partir das amostras de colostro fresco utilizando-se como metodologia a contagem microscópica direta adaptada por Gomes et al. (2011) (Figura 20).

Figura 20 - Esfregaço da secreção mamária do colostro fresco fornecido para as bezerras do grupo com células viáveis (COL+) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: (a) macrófagos presentes em predominância no colostro; (b) neutrófilo; (c) glóbulos de gordura.

A primeira garrafa de colostro foi descongelada lentamente a 37°C para alimentar as bezerras COL- dentro das primeiras seis horas de vida. A segunda alimentação foi realizada no intervalo máximo de doze horas de vida, utilizando-se outra garrafa de colostro descongelado.

Bezerras COL+ foram alimentadas com dois litros de colostro fresco nas primeiras seis horas de vida. O colostro para a segunda mamada foi mantido sob refrigeração a 4°C, levemente aquecido a 37°C pouco antes da sua administração entre seis a 12 horas pós-nascimento.

A cura do umbigo foi realizada 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 COL+ e COL- foram mantidas inicialmente nas baias dentro da maternidade, local onde foram realizados os exames clínicos iniciais, colostragem e cura do umbigo, sendo posteriormente transferidas para o bezerreiro às 6 horas de vida, onde permaneceram em baias de madeira não suspensas até os primeiros três primeiros dias pós-nascimento. Por fim, os animais foram transferidos e permaneceram em gaiolas de metal individuais suspensas, medindo 1,2m x 1m, em local com capacidade para 100 gaiolas, até o final desta pesquisa (Figura 21).

Figura 21 - Alojamento das bezerras durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: (a) alojamento das bezerras recém-nascidas durante as primeiras horas de vida para exame clínico geral, colostragem e cura do umbigo; (b) baia de transição não suspensa onde ficaram até o terceiro dia de vida; (c) bezerreiro para onde as bezerras foram transferidas e permaneceram até o fim do experimento.

A partir deste momento, os animais foram alimentados em baldes, duas vezes ao dia, sendo fornecido um total de seis litros de leite sem antibiótico proveniente do rebanho, além do fornecimento de ração comercial⁵ e água *ad libitum*.

9.2 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

As bezerras foram avaliadas periodicamente logo após o nascimento (D0), entre 24 a 48 horas de vida (D2) e nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-nascimento (D7-D28).

9.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIÓDICA

Os animais foram avaliados clinicamente utilizando-se os escores de diarreia e broncopneumonia realizado de acordo com o *Calf Heath Scoring Criteria* previamente publicado na *University of Wisconsin - Madison* (McGUIRK, 2008).

O escore fecal foi categorizado em escores sendo 0- consistência normal, 1- consistência pastosa e semi-formada, 2- consistência aquosa com maior quantidade de água, com conteúdo fecal aderido no períneo e cauda, 3- líquida, conteúdo fecal aderido no períneo e cauda. A diarreia foi considerada presente quando o escore obtido foi 2 ou 3 (Quadro 6 e Figura 22).

Broncopneumonia foi estabelecida considerando-se os seguintes parâmetros: temperatura retal, tosse, secreção nasal e ocular e posição das orelhas. Para cada item foi atribuído o escore de zero a 3 de acordo com a severidade dos sintomas. A soma dos sintomas acima de 5 foi utilizada para a detecção da Doença Respiratória Bovina (Quadro 7).

A região umbilical foi avaliada por inspeção e palpação periódica da região umbilical para a detecção de sinais inflamatórios.

As anemias foram avaliadas a partir do eritrograma das bezerras. O hematócrito, hemoglobina ou hemácias abaixo dos valores de referência

---

⁵ Rumileite 20®, Guabi

estabelecidos por Brun-Hansen, Kampen e Lund (2006) foram utilizados para a interpretação dos eritrogramas e determinação das anemias. A classificação das anemias foi baseada nos índices hematimétricos (BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND, 2006).

Quadro 6 - 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
Pastosa, 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).

Figura 22 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Quadro 7 - Escores de broncopneumonia adotado para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida

Escores	Temperatura retal (°C)	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 repetida quando estimulada, ou ocasional quando espontânea	Excessiva, mucosa e bilateral	Moderada quantidade bilateral	Ligeiramente pendente, unilateral
3	≥ 39,4	Presente, repetida e espontânea	Abundante, mucopurulenta, bilateral	Intensa quantidade, bilateral	Pendentes intensamente, bilateral ou torção da cabeça

Fonte: (POULSEN; MCGUIRK, 2009).

9.4 AMOSTRAS

Foram obtidas amostras de sangue por meio de punção da veia jugular, utilizando sistema a vácuo, em tubos siliconados sem e com os anticoagulantes EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) (Anexo G) e heparina de sódio.

9.5 ANÁLISES

A partir das amostras sanguíneas foram realizadas dosagens para avaliar o perfil inflamatório das bezerras.

9.5.1 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 automático⁶. A contagem diferencial de

⁶ BC 2800Vet®

leucócitos foi realizada observando-se as características morfológicas das células por microscopia óptica, aumento de 1.000x.

9.5.2 Cortisol

As determinações hormonais de cortisol foram realizadas por ensaio quimiluminescente, utilizando-se kit comercial⁷ em analisador de imunoensaios Immulite 1000® (Siemens). Para a medição quantitativa do cortisol foi utilizado um imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzima químico - luminosas, com ciclo de incubação de 1x30 minutos. O procedimento de ensaio segue o princípio básico de enzima imunoensaio onde existe uma competição entre um antígeno não marcado e um antígeno marcado com enzima, por um número determinado de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de antígeno marcado com enzima é inversamente proporcional à concentração do analítico presente não marcado. O material não ligado é removido por decantação e lavagem das cavidades. Com os níveis de refração da luz, o equipamento mensura a quantidade de cortisol presente na amostra.

9.5.3 Haptoglobina

A concentração de haptoglobina sérica foi avaliada com base na sua habilidade de ligação com a hemoglobina. Uma solução-padrão purificado de haptoglobina de 100 a 1,5 mg/dL, foi utilizado para a preparação da curva padrão. As amostras de soro controle (10µL) foram diluídas em solução salina (90µL) e foi adicionado 50µL de solução de meta-hemoglobina bovina (30mg/dL). A reação foi incubada durante dez minutos à temperatura ambiente, no escuro e em seguida foram adicionados 150µL de substrato de guaiacol e 50 µL de peróxido de hidrogênio. A placa ficou incubada por mais dez minutos no escuro e a leitura da

---

⁷ Cortisol Siemens® Ref: LKCO1, Lot: 0403

absorvância através da densidade óptica foi realizada no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450-500 nm.

9.5.4 Ferro

Alíquotas de soro foram descongeladas em geladeira (overnight), homogeneizadas em homogeneizador automático para posterior realização dos testes bioquímicos em analisador bioquímico automático⁵. Para a dosagem da concentração de ferro foi utilizado kit comercial⁶ (Ferro UIBC, Randox®), empregando-se a metodologia descrita pelo fabricante.

9.5.5 Imunofenotipagem dos Neutrófilos

As subpopulações e ativação dos leucócitos sanguíneos foram avaliadas utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. Inicialmente, alíquotas do sangue total obtidas em tubos com EDTA (100µL) foram distribuídas em tubos de citometria de fluxo. Os eritrócitos foram lisados pela adição de 900µL de solução comercial⁸ (*Facslysing*), e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. Inicialmente, dois anticorpos monoclonais primários: *mouse anti-bovine* (Washington State University) foram adicionados para a marcação celular na mesma diluição baseados nas titulações. Desta forma, tanto CH138 (IgM - CH138A), quanto CD62-L (IgG1 - CC32) foram diluídos em 1:400.

As amostras foram incubadas por 40 minutos a 4°C para que houvesse marcação celular e em seguida, foram submetidas a três lavagens com solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Anexo H). Posteriormente, foram adicionados anticorpos monoclonais secundários para emissão das fluorescências identificadas pelo citômetro de fluxo⁹. O fluorocromo APC (*Allophycocyanin*) (INVITROGEN, U.S.A.) foi utilizado como anticorpo secundário para o CH138 (APC – M31505) e o fluorocromo PE (*Phycoerythrin*) (BENCTON DICKINSON, U.S.A.) foi utilizado como

---

⁸ BD nº catálogo: 349202

⁹ FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA)

anticorpo secundário para o CD62-L (PE – P-21129). Os anticorpos secundários foram previamente diluídos em 1:200, adicionados às células, incubados por 30 minutos refrigeradas e mantidos em ambiente escuro.

As amostras foram então submetidas a três lavagens com PBS e ressuspensas em 300µL e reservadas para avaliação das fluorescências emitidas nos comprimentos de onda 650-660nm (APC) e 480nm (PE) em citômetro de fluxo.

Os eventos foram adquiridos no citômetro utilizando o software CellQuest, selecionando os granulócitos a partir do seu tamanho - *forward scatter* (FSC) e granulosidade - *side scatter* (SSC). Para isso, foram adquiridas dez mil células para os neutrófilos no *gate* correspondente aos granulócitos.

As células foram avaliadas quanto à fluorescência emitida pelos anticorpos secundários utilizando-se o software FlowJo® (Tree Star, EUA), versão 7.2.5. Os resultados foram expressos em porcentagem do *gate* de células positivas para cada marcador e os histogramas foram estabelecidos para avaliar a proporção de células em cada fluorescência. Os *dot plot* (gráficos emitidos a partir do citômetro) foram interpretados a partir das cores para estabelecer as populações celulares (Figuras 23 a 26).

Figura 23 - Avaliação da proporção de granulócitos no sangue de bezerras Holandesas no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) Distribuição dos leucócitos sanguíneos; (b) seleção da população de granulócitos em relação ao total de eventos adquiridos

Figura 24 - Ensaio de avaliação da L-selectina – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) histograma demonstrando a população $CD62L^+$ (FL2⁺); (b) plotagem das células expressando os marcador $CD62L^+$ no Q3 (FL2⁺).

Figura 25 - Ensaio de avaliação do CH138⁺ – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) histograma demonstrando a população $CH138^+$ (FL4⁺); (b) plotagem das células expressando o marcador $CH138^+$ no Q3 (FL4⁺).

Figura 26 - Ensaio de avaliação do duplo positivo para CD62L⁺ e CH138⁺ – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) histograma demonstrando a população CD62L⁺ (FL2⁺); (b) histograma demonstrando a população CH138⁺ (FL4⁺); (c) plotagem das células expressando os marcadores CD62L⁺CH138⁺ no quadrante duplo positivo (circulado).

9.5.6 Fagocitose e Produção Peróxido de Hidrogênio

Para realização desta prova, foram utilizadas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas do leite de vaca com mastite, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Nilson Roberti Benites. As bactérias foram marcadas com Iodeto de Propídeo segundo procedimento descrito por Silva (2014).

Para a realização dos ensaios (Quadro 8), foram adicionados 100µL de sangue heparinizado contendo aproximadamente 2×10^5 células em tubos de citometria de fluxo. Em seguida, foram adicionados 200µL da solução de uso do DCFH-DA¹⁰ (Anexo I), 50µL da bactéria marcada, ajustando-se o volume final da mistura para 1100µL, utilizando PBS suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. A mistura foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos, mantida em suspensão com o uso de homogeneizador. Em seguida, foram adicionados 2mL de EDTA 3mM (Anexo I) gelado, nos ensaios onde as bactérias foram acrescidas. Logo após, foi realizada a lise das hemácias para lavagem das células e retirada do excesso de Iodeto de Propídeo.

¹⁰ Sigma® Aldrich, St. Louis, EUA, nº cat. D6883.

Para a lise das hemácias foi adicionado 1mL de água destilada ao *pellet*, homogeneizado no agitador de tubos por 15 segundos, e imediatamente foi acrescido 1mL de PBS 2x concentrado (Anexo J). Imediatamente em seguida, foi adicionado 3mL de PBS gelado. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos, 783xG, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* e ressuspendido em 1mL de PBS. O ensaio foi centrifugado novamente nas mesmas condições (5 minutos, 783xG, 4°C) e o *pellet* foi ressuspendido em 300µl de PBS para realização da leitura no citômetro de fluxo¹¹, onde foram adquiridos 20.000 eventos utilizando-se o *software* CellQuest®.

A análise das fluorescências emitidas foi realizada utilizando-se *software* FlowJo®. Inicialmente, a população de granulócitos foi selecionada no ensaio contendo células sem anticorpos (branco) e copiada para os demais ensaios. Em seguida, a produção de H₂O₂ basal e determinação do limite para a fluorescência FL1 foi avaliada nos tubos onde foram adicionados células e o substrato DCFH. Os próximos tubos da análise eram os que continham apenas as células e bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para a determinação do limite da fluorescência FL2. Por fim, após terem sido estabelecidos os cortes a partir dos controles, contendo células não marcadas e marcações simples, realizou-se às análises dos ensaios que continham DCFH-DA e bactérias. Neste tubo, foram analisados tanto a fluorescência FL1 e FL2 para a determinação da fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio na presença dos estímulos bacterianos (Figuras 27 a 31).

Quadro 8 - Ensaio de fagocitose e produção de H₂O₂ do sangue de bezerras Holandesas

Tubo	Fluorescência	Sangue	DCFH	BACT	PBS SFB 10%	Evento
A	Branco	S	-	-	S	Branco
B	FL1	S	S	-	S	<i>Burst</i> Basal
C	FL2	S	-	<i>Sapi</i>	S	Fagocitose
D	FL2	S	-	<i>E.coli</i>	S	Fagocitose
E	Ensaio 1	S	S	<i>Sapi</i>	S	Fagocitose/ <i>Burst</i>
F	Ensaio 2	S	S	<i>E.coli</i>	S	Fagocitose/ <i>Burst</i>

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: Bact – Bactéria; S – Acrescido no tubo.

¹¹ FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System®), San Diego, CA

Figura 27 - Avaliação da proporção de PMN no sangue de bezerras Holandesas – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) Distribuição dos leucócitos sanguíneos; (b) Seleção dos PMN em relação ao total de eventos adquiridos.

Figura 28 - Avaliação da produção de H_2O_2 basal, sem estímulos bacterianos, pelas células PMN com DCFH-DA. Seleção do eixo FL1⁺ para avaliação da produção de H_2O_2 pelos PMN sem estímulo bacteriano – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) histograma demonstrando a produção de H_2O_2 basal (FL1⁺); (b) plotagem das células produzindo H_2O_2 basal (FL1⁺).

Figura 29 - Avaliação da fagocitose das células PMN do sangue de bezerras Holandesas que fagocitaram *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) Histograma demonstrando a fagocitose dos PMN estimulados com *Staphylococcus aureus* (FL2⁺); (b) plotagem das células fagocitando *Staphylococcus aureus* (FL2⁺); (c) Histograma demonstrando a fagocitose dos PMN estimulados com *Escherichia coli* (FL2⁺); (d) plotagem das células fagocitando *Escherichia coli* (FL2⁺).

Figura 30 - Avaliação da produção de H_2O_2 e fagocitose pelas células PMN do sangue de bezerras Holandesas com DCFH-DA e *Staphylococcus aureus* – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) Histograma para avaliação da produção de H_2O_2 pelas células PMN (FL1⁺); (b) plotagem das células para avaliação da produção de H_2O_2 pelas células PMN (FL1⁺); (c) histograma para avaliação da fagocitose pelas células PMN estimuladas com *S. aureus* (FL2⁺); (d) plotagem para avaliação da fagocitose pelas células PMN estimuladas com *S. aureus* (FL2⁺).

Figura 31 - Avaliação da produção de H_2O_2 e fagocitose pelas células PMN do sangue de bezerras Holandesas com DCFH-DA e *Escherichia coli* – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: (a) Histograma para avaliação da produção de H_2O_2 pelas células PMN (FL1⁺); (b) plotagem das células para avaliação da produção de H_2O_2 pelas células PMN (FL1⁺); (c) histograma para avaliação da fagocitose pelas células PMN estimuladas com *E. coli* (FL2⁺); (d) plotagem para avaliação da fagocitose pelas células PMN estimuladas com *E. coli* (FL2⁺).

9.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados em planilhas (Microsoft Excel® 2010), e posteriormente analisados com o software estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Para que fosse possível uma análise paramétrica, a transformação logarítmica foi utilizada. Sendo assim, o Teste t de *Student* para amostras independentes foi realizado para comparação entre os grupos (COL+ e COL-) e a análise de variância (ANOVA) realizada para comparação entre os tempos (D0 a D28) dentro do mesmo grupo. No caso onde ocorreram as transformações logarítmicas, o p apresentado nas tabelas diz respeito aos testes relacionados com os valores em $\log_{10}$, enquanto os valores descritos são reais.

Todas as análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ e tendência quando $p > 0,05$ e $p < 0,1$. Análises descritivas foram apresentadas pela média e desvio padrão.

10 RESULTADOS

Este trabalho avaliou a influência das células do colostro na resposta imune inata e saúde de bezerras Holandesas durante o primeiro mês de vida.

10.1 STATUS SANITÁRIO

A diarreia teve início no D2 e a frequência aumentou do D7 (COL+ = 56%; COL- = 70%) ao D14 (COL+ = 78%; COL- = 60%). Após estes momentos, as bezerras apresentaram uma ligeira diminuição da frequência no D21 (COL+ = 56%; COL- = 50%) e D28 (COL+ = 44%; COL- = 50%) (Figura 32).

A região umbilical externa foi avaliada através da inspeção e palpação periódica para a detecção de sinais inflamatórios. Desta forma, foi possível detectar que três bezerras do grupo COL- apresentaram inflamação umbilical no D14 (n=2) e D28 (n=1). Além disso, também foram detectadas duas bezerras com broncopneumonia em ambos os grupos: COL+ no D14 (n=1) e COL- no D21 (n=1).

Apesar da maior frequência de doenças encontradas no grupo COL-, não foi possível comprovar diferenças estatísticas entre a frequência de diarreia ou doenças totais usando o teste Qui-Quadrado.

A interpretação individual do eritrograma de cada bezerra mostrou anemia do D2 até o D28 de acordo com os valores de referência estabelecidos por Brun-Hansen; Kampen; Lund (2006) (Figura 33).

As frequências de anemias observadas foram de 20 e 30% no D2, 10 e 10% no D7, 20 e 50% no D14, 0 e 40% no D21 e 0 e 50% no D28 para bezerras do COL+ e COL-, respectivamente. As bezerras do COL- apresentaram maior frequência de anemia no D21 (COL+ = 0%; COL- = 40%; $P=0,03$) e D28 (COL+ = 0%; COL- = 50%; $P=0,02$).

Durante todo o experimento foram observados 23 episódios de anemia. A anemia predominantemente de acordo com a morfologia dos eritrócitos foi a normocítica hipocrômica. As frequências de anemias microcítica, macrocítica e normocítica foram 21,7% (5/23), 56,52% (13/23) e (21,7%) 5/23, respectivamente.

Anemia normocítica foi observada em 11/23 bezerras (47,8%) e 12/23 (52,17%), respectivamente. Anemia normocítica foi observada em 11/23 (47,8%) e 12/23 (52,17%) dos casos.

Figura 32 - Frequência do escore fecal e incidência de diarreia em bezerras Holandesas (COL+) e (COL-) durante o primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Figura 33 - Frequência de anemias em bezerras Holandesas (COL+) e (COL-) durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: S.A.: sem alteração; An No Hipo: anemia normocítica hipocrômica; An Mac Hipo: anemia macrocítica hipocrômica; An No No: anemia normocítica normocrômica; An Mi No: anemia microcítica normocrômica; An Mi Hipo: anemia microcítica hipocrômica.

10.2 CORTISOL

O estresse ao qual as bezerras foram submetidas nos primeiros dias de vida foi mensurado através da dosagem do cortisol, observando-se perfil semelhante os

grupos COL + e COL-. O pico máximo de cortisol foi observado no D0 (COL+: 12,27 µg/dL; COL-: 11,53 µg/dL), em seguida, os valores apresentaram um decréscimo gradual até o D28 (COL+: 0,81 µg/dL; COL-: 0,35 µg/dL). Apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas entre os grupos, foi possível observar diferença entre os momentos D0 e D21 no grupo COL+, onde $p = 0,048$ (Tabela 7 e Figura 34).

Tabela 7 - Concentração de cortisol sérico (µg/dL) em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Momentos (dias)		D0	D2	D7	D14	D21	D28
Cortisol (µg/dL)	COL+	12,27 ±2,23 ^e	6,05 ±3,43	3,16 ±1,68	1,70 ±1,49	0,95 ±0,73 ^a	0,81 ±0,80
	COL-	11,53 ±2,38	4,81 ±2,59	3,45 ±1,12	1,09 ±0,95	0,71 ±1,01	0,35 ±0,75
	p	0,479	0,150	0,886	0,163	0,483	0,359

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos, sendo (a) valores diferentes do D0; (b) valores diferentes do D2; (c) valores diferentes do D7; (d) valores diferentes do D14; (e) valores diferentes do D21; (f) valores diferentes do D28, quando $p < 0,05$; tendência quando $P \leq 0,10$

Figura 34 - Concentração de cortisol sérico (µg/dL) em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

10.3 HAPTOGLOBINA

As concentrações e densidades ópticas obtidas para a haptoglobina sérica durante o primeiro mês de vida estão dispostas na tabela 8 e figura 35. Os valores obtidos para a concentração de haptoglobina foram crescentes do D0 (COL+: 1,24; COL-: 1,34 mg/dL), atingindo pico máximo no D7 (COL+: 5,38; COL-: 5,27 mg/dL) e D14 (COL-: 5,70 mg/dL), observando-se decréscimo dos valores nos momentos subsequentes (COL+: 1,67-2,24; COL-: 1,31-1,71 mg/dL). Apesar destas variações observadas, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos e momentos para a concentração e densidade óptica da haptoglobina.

Tabela 8 - Valores da concentração (mg/dL) e densidade óptica (DO) para a haptoglobina sérica em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Momentos (dias)		D0	D2	D7	D14	D21	D28
Hp (mg/dL)	COL+	1,24 ±0,41	1,28 ±0,50	5,38 ±9,17	1,67 ±0,99	2,24 ±3,24	1,80 ±1,93
	COL-	1,34 ±0,59	1,56 ±0,49	5,27 ±6,18	5,70 ±12,28	1,31 ±0,45	1,71 ±0,91
	P	0,802	0,873	0,682	0,454	0,686	0,365
Hp (DO)	COL+	0,37 ±0,03	0,37 ±0,03	0,48 ±0,22	0,41 ±0,08	0,39 ±0,13	0,38 ±0,09
	COL-	0,35 ±0,02	0,35 ±0,01	0,44 ±0,18	0,45 ±0,18	0,38 ±0,05	0,34 ±0,03
	P	0,178	0,083 †	0,620	0,589	0,828	0,170

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$).

Figura 35 - Haptoglobina sérica em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: (a) concentração da haptoglobina em mg/dL; (b) valores da densidade óptica da haptoglobina; † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$).

10.4 FERRO

A concentração de ferro sérico obtido para bezerras recém-nascidas estão dispostos na tabela 9 e figura 36.

O pico máximo de ferro observado para ambos os grupos foi no D0 (COL+ = $21,76 \mu\text{M/L}$ e COL- = $15,41 \mu\text{M/L}$). A partir do D7, o grupo COL- ($5,61 \mu\text{M/L}$) apresentou menor concentração de ferro sérico quando comparado ao COL+ ($10,74 \mu\text{M/L}$). Este perfil permaneceu até o D28. Foi possível observar diferença estatística entre os grupos no D7 ($p = 0,031$) e diferença entre os momentos D0 e D7 no grupo COL-.

Tabela 9 - Valores da concentração de ferro sérico ($\mu\text{M/L}$) em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-), durante o primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Momentos (dias)		D0	D2	D7	D14	D21	D28
Ferro ($\mu\text{M/L}$)	COL+	21,67 $\pm 9,14$	8,98 $\pm 2,68$	10,74 $\pm 6,21$	13,26 $\pm 10,68$	9,73 $\pm 6,32$	11,15 $\pm 10,48$
	COL-	15,41 $\pm 9,81^c$	10,08 $\pm 4,20$	5,61 $\pm 2,75^a$	9,60 $\pm 6,94$	7,30 $\pm 3,15$	10,67 $\pm 6,55$
	P	0,144	0,698	0,031 *	0,404	0,525	0,689

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos, sendo (a) valores diferentes do D0; (b) valores diferentes do D2; (c) valores diferentes do D7; (d) valores diferentes do D14; (e) valores diferentes do D21; (f) valores diferentes do D28, quando $p < 0,05$; tendência quando $P \leq 0,10$.

Figura 36 - Valores de concentração sérica de ferro ($\mu\text{M/L}$) em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-) - São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: * indica diferença entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$).

10.5 LEUCÓCITOS TOTAIS E NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS

Os valores médios e desvio padrão absolutos e relativos para leucócitos totais (*White Blood Cells-WBC*) e neutrófilos (NEUTR) estão apresentados na tabela 10 e figura 37.

As bezerras de ambos os grupos apresentaram pico máximo do WBC no D7 (COL+= $12,37 \times 10^3/\mu\text{L}$ e COL- = $11,75 \times 10^3/\mu\text{L}$), observando-se diminuição dos valores nos momentos subsequentes até D21 (COL+= $7,55 \times 10^3/\mu\text{L}$ e COL- = $9,61 \times 10^3/\mu\text{L}$). No D28 detectou-se o menor valor médio de WBC para o COL- ($6,91 \times 10^3/\mu\text{L}$), em contrapartida, bezerras COL+ apresentaram aumento no número dessas células ($9,42 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Os valores de neutrófilos decresceram do pico que ocorreu no D7 ($8,47 \times 10^3/\mu\text{L}$) até o D21 ($3,07 \times 10^3/\mu\text{L}$) no grupo COL+. O grupo COL- apresentou perfil diferente, observando decréscimo gradual dos valores desde o D0 ($7,81 \times 10^3/\mu\text{L}$) até o D28 ($2,54 \times 10^3/\mu\text{L}$).

A comparação entre os grupos COL+ e COL- para WBC e NEUTR não possibilitou a detecção de diferenças entre os grupos, porém foi possível observar tendência na proporção de neutrófilos no momento D7 ($P = 0,073$).

As diferenças obtidas para as comparações múltiplas entre os momentos pode ser visualizada na tabela 10.

Tabela 10 - Médias e desvios-padrão para os leucócitos totais (WBC) e neutrófilos (NEUTR) do sangue de bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) - São Paulo - 2016

Momentos (dias)		D0	D2	D7	D14	D21	D28
WBC (10 ³ /μL)	COL+	10,89 ±2,72	10,19 ±5,88	12,37 ±5,23	8,03 ±2,75	7,55 ±3,39	9,42 ±3,92
	COL-	11,41 ±4,23 ^f	9,61 ±4,23	11,75 ±5,81	9,52 ±4,20	9,61±3,18	6,91 ±1,65 ^a
	P	0,772	0,827	0,802	0,336	0,275	0,134
NEUTR (10 ³ /μL)	COL+	7,96 ±2,34 ^{def}	7,60 ±5,73	8,47 ±5,06	3,38 ±1,92 ^a	3,07 ±2,87 ^a	3,93 ±2,30 ^a
	COL-	7,81 ±3,65 ^f	6,61 ±3,63	6,28 ±4,13	5,03 ±3,30	4,61 ±2,72	2,54 ±1,10 ^a
	P	0,930	0,690	0,349	0,196	0,325	0,167
NEUTR (%)	COL+	72,70 ±9,83 ^{def}	66,30 ±21,07 ^e	63,50 ±14,28 ^{def}	39,90 ±13,11 ^{ac}	36,00 ±15,29 ^{abc}	39,60 ±11,54 ^{ac}
	COL-	67,20 ±9,31 ^{ef}	64,00 ±13,94 ^{ef}	49,60 ±12,64	49,30 ±11,92	44,30 ±14,92 ^{ab}	35,30 ±12,18 ^{ab}
	P	0,239	0,783	0,073 †	0,143	0,296	0,455

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos, sendo (a) valores diferentes do D0; (b) valores diferentes do D2; (c) valores diferentes do D7; (d) valores diferentes do D14; (e) valores diferentes do D21; (f) valores diferentes do D28, quando $p < 0,05$; tendência quando $P \leq 0,10$.

Figura 37 - Leucócitos totais (WBC) e neutrófilos (NEUTR) do sangue de bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células (COL-) - São Paulo - 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$)

10.6 EXPRESSÃO DE MARCADORES NOS GRANULÓCITOS

As proporções de células e marcadores dos granulócitos estão dispostos na tabela 11 e figura 38.

A proporção de PMN no COL+ aumentou levemente do D0 (40,25%) ao D7 (45,83%), em seguida, os valores diminuíram (27,46-34,44%). O COL- apresentou média mínima no D0 (34,06%), pico máximo no D2 (53,25%), leve redução entre D7 ao D21 (41,79-45,14%) seguida por redução marcante no D28 (36,76%). Foi possível detectar diferença estatística entre os grupos no D21 ($p=0,036$) e tendência no D14 ($p=0,056$). Não foi possível observar diferença estatística entre os

momentos.

O perfil apresentado pelos grupos experimentais em relação à proporção de granulócitos CH138⁺ expressando ou não o receptor CD62L⁺ foi diferente apesar da ausência de diferenças estatísticas (P=0,095).

Foi observada elevada proporção de granulócitos CH138⁺ expressando L-selectina em ambos os grupos no D0 (COL+: 87,73%; COL-: 88,51%). A partir deste momento, os animais apresentaram perfil diferenciado, observando-se aumento gradual das proporções destas células no COL- (45,14%) e queda no COL+ (80,65%) até D14. Após, o COL- apresentou queda brusca (78,70%) e aumento subsequente no D28 (98,88%), enquanto o COL+ apresentou aumento (89,96%) no D21 e ligeira diminuição no D28 (85,78%).

Tabela 11 - Médias e desvios-padrão para as proporções de granulócitos CH138⁺ expressando o receptor CD62-L em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Momentos (dias)		D0	D2	D7	D14	D21	D28
PMN (%)	COL+	40,25 ± 20,57	41,39 ±17,02	45,83 ±19,47	34,44 ±13,27	27,46 ±11,28	33,92 ±12,94
	COL-	34,06 ±16,4	53,25 ±21,55	42,79 ±16,23	45,14 ±10,04	41,79 ±13,64	36,76 ±15,27
	P	0,530	0,308	0,819	0,056 †	0,036 *	0,851
CH138 ⁺ CD62L ⁺ (%)	COL+	87,73 ± 30,70	87,71 ±16,67	85,94 ±24,65	80,65 ±29,67	89,96 ±14,78	85,78 ±32,31
	COL-	88,51 ±30,58	91,34 ±11,21	95,19 ±5,41	97,03 ±1,91	78,70 ±43,99	98,88 ±1,72
	P	0,839	0,539	0,290	0,303	0,401	0,332
CH138 ⁺ CD62L ⁻ (%)	COL+	0,68 ±0,84	2,61 ±5,94	2,03 ±6,28	2,40 ±5,00	0,00 ±0,01	0,02 ±0,06
	COL-	9,93 ±9,51	3,03 ±6,99	0,44 ±0,61	0,09 ±0,16	0,47 ±0,97	0,02 ±0,06
	P	0,295	0,819	0,859	0,095 †	0,512	0,854

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: * indica diferença entre os grupos naquele momento (p>0,05); † indica tendência entre os grupos naquele momento (p>0,05 e < 0,1)

Figura 38 - Proporção de granulócitos CH138+ expressando o receptor CD62L em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: * indica diferença entre os grupos e † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$)

10.7 FUNÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

A proporção e intensidade (Média Geométrica) da fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos, estimulados ou não, estão dispostos na tabela 12 e figuras 39 e 40.

A proporção de granulócitos que fagocitaram *S. aureus* foi semelhante entre as bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-). A proporção mínima de células fagocitando foi observada no D0 para ambos os grupos (COL+ = 45,78%; COL- = 33,76%), em seguida, observou-se rápido aumento no índice de fagocitose no D2 (COL+ = 89,29%; COL- = 89,04%). Os valores decresceram gradualmente até o D21 (COL+ = 62,82%; COL- = 65,01%),

observando-se decréscimo para o COL- (61,8%) e acréscimo para o COL+ (76,35%) no D28. Não foi possível detectar diferenças estatísticas entre os grupos durante o primeiro mês de vida ($P \geq 0,110$).

A intensidade da fagocitose da bactéria *Staphylococcus aureus* pelos granulócitos foi mínima no D0 para ambos os grupos (COL+: 15,15; COL-: 5,1), observando-se rápido aumento em D2 (COL+: 204,54; COL-: 158,07). A partir do D2, o perfil apresentado entre os grupos foi diferenciado, detectando-se queda gradativa no COL + até D28 (52,27) e aumento gradativo no COL- até D14 (272,08) com queda nos momentos subsequentes (29,45-36,27). Apesar destas variações, foi possível detectar tendência estatística apenas no 28 ($P=0,081$).

A proporção de granulócitos que fagocitaram *Escherichia coli* também foi semelhante entre as bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) ($P \geq 0,102$). Ambos os grupos apresentaram valores mínimos no D0 (COL+ = 35,68%; COL- = 32,36%), observando-se aumento acentuado no D2 para o COL+ (87,44%) e COL- (77,92%). Após, os valores de ambos os grupos decresceram no D21 (COL+ = 55,04%; COL- = 55,71%) e aumentaram no momento subsequente (COL+ = 73,67%; COL- = 65,47%).

A intensidade da fagocitose da bactéria *Escherichia coli* pelos granulócitos foi mínima no D0 para ambos os grupos (COL+: 4,38; COL-: 4,59), observando-se rápido aumento em D2 (COL+: 179,17; COL-: 118,28). A partir do D2, o perfil apresentado entre os grupos foi diferenciado, detectando-se queda gradativa até D21 (23,70) e aumento no D28 (79,97) no COL +, em contrapartida, o COL- teve aumento gradativo até D14 (252,98) com queda nos momentos subsequentes (18,31-43,50). Foi possível detectar diferenças estatísticas entre os grupos no D7 ($P=0,034$).

As diferenças obtidas para a fagocitose das bactérias *S.aureus* e *E.coli*, considerando-se as comparações múltiplas entre os momentos, pode ser visualizada na tabela 12.

A produção espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos (%) apresentou perfil diferenciado entre os grupos COL+ e COL-. O grupo COL+ apresentou leves variações (89,64-83,51%) durante o estudo considerando-se a proporção de células produzindo H_2O_2 , enquanto o COL- apresentou aumento do D0 (COL- = 89,38%) ao D14-D28 (91,25-94,41%). Foi possível detectar tendência estatística entre os grupos no D14 ($P=0,061$), momento em que o COL- (94,41%)

apresentava maior proporção de células produzindo H_2O_2 que o COL+ (90,43%). Apesar das variações relatadas entre os momentos, não foi possível detectar diferenças estatísticas.

A intensidade da produção espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos foi mínima no D0 (COL+: 234,55; COL-: 280,14), em seguida o perfil foi diferenciado entre os grupos. O grupo COL+ apresentou aumento gradual na intensidade da fluorescência até D21 (727,50) e redução em D28 (395,20), em contrapartida, o COL- apresentou leves oscilações no período com pico máximo no D7 (406,80). Foi possível observar tendência estatística entre os grupos no D21, observando-se maior intensidade de fluorescência no COL+ (727,50) em relação ao COL- (243,40) ($P=0,094$). Apesar das variações relatadas entre os momentos, não foi possível detectar diferenças estatísticas.

O perfil apresentado para a proporção e intensidade da produção de H_2O_2 pelos granulócitos foram semelhantes para as duas bactérias usadas como estímulo, entretanto ficou nítida a diferença entre os grupos que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-).

A produção espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos (%), quando estimulados pelo *S.aureus*, sofreram poucas variações. O COL+ (95,73%) maiores valores que o COL- (92,37%) em D7, observando-se diferença estatística ($P=0,008$). Foi observada tendência estatística no D0 entre os grupos ($P=0,092$). Não foi possível detectar diferenças entre os momentos.

A intensidade da produção espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos quando estimulados com *S.aureus* foi crescente no COL + do D0 (584) ao D21-D28 (929,5-1011,8), em contrapartida, o COL- apresentou aumento do D0 (359,2) ao D2 (739,1) e valores constantes nos momentos subsequentes (739,1-864,9). Foi observada tendência estatística no D0 entre os grupos ($P=0,089$). Não foi possível detectar diferenças entre os momentos.

A produção espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos (%), quando estimulados pelo *E.coli* sofreram poucas variações. O COL+ apresentou variações nos valores, detectando-se quedas do D0 (94,94%) ao D2 (89,66%), D14-D21 (86,51-85,81%) e aumento em D28 (93,57%). O COL- apresentou valores constantes do D0 (91,21%) ao D14 (90,43%), detectando-se leve aumento no D21 (92,14%) e queda em D28 (85,98%). Foi possível detectar tendências no D1 (0,084) e diferenças estatísticas entre os grupos no D28

($P=0,040$). Não foi possível detectar diferenças entre os momentos, apesar das variações relatadas.

A intensidade da produção espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos granulócitos quando estimulados com *E.coli* foi constante no COL- do D0 ao D28 (406,6-528,10), enquanto o COL+ apresentou aumento crescente no decorrer do estudo (505,9-746,80). Apesar destas variações não foi possível detectar diferenças entre os momentos e grupos experimentais.

Tabela 12 - Proporção (%) e intensidade da fagocitose (Média Geométrica – Geo Mean) e produção de peróxido de hidrogênio pelos granulócitos em bezerras Holandesas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo – 2016

Momentos (dias)		D0	D2	D7	D14	D21	D28
<i>S.aureus</i> Índice Fagocitose (%)	COL+	45,78 ±27,6	89,29 ±11,15	79,98 ±26,26	71,13 ±22,79	62,82 ±22,02	76,35 ±14,27
	COL-	33,76 ±18,72 ^{bce}	89,04 ±10,77 ^a	84,71 ±15,43 ^a	77,82 ±27,04	65,1 ±18,26 ^a	61,8 ±26,67
<i>S.aureus</i> Fagocitose (Geo Mean)	COL+	15,15 ±28,63 ^{bcd}	204,54 ±187,45 ^{ae}	117,99 ±101,49 ^a	103,98 ±152,02	25,72 ±20,43 ^b	52,27 ±41,14 ^a
	COL-	5,1 ±3,38 ^{bcd}	158,07 ±142,41 ^a	211,6 ±155,27 ^a	272,08 ±198,71 ^a	29,45 ±28,15 ^a	36,27 ±55,49 ^a
<i>E.coli</i> Índice Fagocitose (%)	COL+	35,68 ±22,47	87,44 ±11,68	72,49 ±23,96	65,19 ±28,37	55,04 ±16,80	73,67 ±16,54
	COL-	32,36 ±20,41 ^c	77,92 ±17,06 ^e	81,63 ±13,06 ^a	82,52 ±21,66	55,71 ±18,75 ^b	65,47 ±13,08
<i>E.coli</i> Fagocitose (Geo Mean)	COL+	4,38 ±1,32 ^{bcd}	179,17 ±164,14 ^a	89,47 ±82,91 ^a	63,65 ±103,77	23,70 ±32,70 ^a	79,97 ±95,05 ^a
	COL-	4,59 ±1,50 ^{bcd}	118,28 ±128,14 ^a	167,08 ±110,44 ^a	252,98 ±244,98 ^a	18,32 ±18,64 ^f	43,50 ±54,98 ^{ae}
Produção espontânea H ₂ O ₂ (%)	COL+	91,44 ±6,19	89,64 ±7,09	91,82 ±7,59	90,43 ±5,77	91,03 ±8,74	93,51 ±3,93
	COL-	84,20 ±14,31	91,03 ±5,45	89,21 ±7,74	94,41 ±1,85	93,20 ±5,51	91,25 ±11,72
Produção espontânea H ₂ O ₂ (Geo Mean)	COL+	234,55 ±236,24	281,47 ±292,64	300,86 ±290,58	437,30 ±248,76	727,50 ±857,22	395,20 ±212,87
	COL-	280,14 ±261,76	299,77 ±181,45	406,80 ±373,55	343,40 ±110,91	243,40 ±85,67	372,30 ±149,54
<i>S.aureus</i> Produção H ₂ O ₂ (%)	COL+	93,88 ±4,58	87,65 ±12,31	95,73 ±1,77	88,88 ±6,77	87,51 ±12,33	88,1 ±16,07
	COL-	89,38 ±6,38	91,45 ±9,02	92,37 ±3,01	91,35 ±3,8	92,45 ±4,9	90,9 ±6,09
<i>S.aureus</i> Produção H ₂ O ₂ (Geo Mean)	COL+	584 ±392,64	603,1 ±526,54	722,7 ±609,84	954,7 ±762,59	1011,8 ±1023,82	929,5 ±511,97
	COL-	359,2 ±220,75 ^{d f}	739,1 ±505,25	801 ±767,01	864,9 ±306,87 ^a	692,8 ±253,67	812,4 ±219,56 ^a
<i>E.coli</i> Produção H ₂ O ₂ (%)	COL+	94,94 ±2,51	89,66 ±6,59	94,08 ±4,05	86,51 ±8,30	85,81 ±12,01	93,57 ±4,31
	COL-	91,21 ±5,79	91,14 ±5,86	91,47 ±4,13	90,43 ±5,42	92,14 ±5,71	85,98 ±10,98
<i>E.coli</i> Produção H ₂ O ₂ (Geo Mean)	COL+	505,90 ±234,58	427,44 ±367,05	557,50 ±669,89	661,60 ±584,71	771,70 ±692,03	746,80 ±310,67
	COL-	406,60 ±252,43	457,56 ±236,20	508,10 ±410,26	534,30 ±207,22	490,80 ±219,55	528,10 ±187,24

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016)

Legenda: letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos, sendo (a) valores diferentes do D0; (b) valores diferentes do D2; (c) valores diferentes do D7; (d) valores diferentes do D14; (e) valores diferentes do D21; (f) valores diferentes do D28, quando $p < 0,05$ e tendência quando $P \leq 0,10$. * indica diferença entre os grupos e † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$); * indica diferença entre os grupos e † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$).

Figura 39 - Proporção (%) e intensidade da fagocitose (Média Geométrica– Geo Mean) da fagocitose pelos granulócitos mediante liberação espontânea ou estimulados, em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) – São Paulo - 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: * indica diferença entre os grupos e † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$)

Figura 40 - Produção de peróxido de hidrogênio (% e intensidade – Média Geométrica – Geo Mean) pelos granulócitos, mediante liberação espontânea ou estimulados, em bezerras Holandesas recém-nascidas que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) - São Paulo - 2016

Fonte: (COSTA, J. F. R., 2016).

Legenda: * indica diferença entre os grupos e † indica tendência entre os grupos naquele momento ($p > 0,05$ e $< 0,1$)

11 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou a influência das células do colostro na resposta imune inata e ocorrência de diarreias em bezerras recém-nascidas.

11.1 QUALIDADE DO COLOSTRO

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.

Novo et al. (2014) demonstraram que não há células viáveis após congelamento das amostras em freezer -20°C . No estudo da equipe foram feitos testes a partir de uma hora de congelamento, com intervalos de hora em hora até 6 horas no freezer e após 24 horas. Em todas as análises foi possível observar que o congelamento lisou as células, tornando-as inviáveis. Langel et al. (2015) utilizaram os mesmos grupos experimentais (COL+ e COL-) para desenvolver seu trabalho, porém com a diferença que o colostro congelado que as bezerras mamaram foi congelado em nitrogênio líquido para que o processo de lise das células ocorresse de forma rápida e, assim, fosse possível que a bezerra recebesse o colostro congelado de sua própria mãe. Desta forma, não precisaram mamar colostro de doadoras, como ocorreu neste experimento.

A concentração de Igs do colostro e sólidos totais dos dois grupos experimentais apresentaram valores adequados, segundo o limiar inicial e bem consolidado de 50g/L estabelecidos por Chigerwe et al. (2008); Godden (2008); Morril et al. (2012) e Quigley et al. (2013). Se considerarmos o ponto de corte determinado mais recentemente para o teor de IgG ($\text{IgG} \geq 80\text{g/L}$) e sólidos totais ($\geq 23\%$), respectivamente, determinados pelo colostrômetro e refratômetro Brix, os

valores continuam acima deste limiar, garantindo assim que foi fornecido colostro de alta qualidade para as bezerras deste experimento, acima do recomendado pela literatura atual (BARTIER; WINDEYER; DOEPEL, 2015).

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

11.2 STATUS SANITÁRIO DAS BEZERRAS

A principal doença que acometeu as bezerras deste experimento no período neonatal foi a diarreia. Através da avaliação dos escores pode-se observar que a doença teve início no D2 e perdurou pelas próximas três semanas. A maior ocorrência de diarreia foi observada em ambos os grupos no D7 e D14.

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 diarreia severa, com escore de fezes igual a 3.

Riedel-Caspari (1993) após infectar as bezerras com *E. coli* observou a manifestação de diarreias em ambos os grupos de bezerras que haviam recebido colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-). As bezerras que mamaram colostro acelular apresentaram quadro clínico de maior intensidade, considerando o aumento de temperatura retal durante todo o período, além da maior eliminação por tempo prolongado de *E. coli* nas fezes. Estes dados coincidem com os achados da presente pesquisa, considerando-se maior frequência de escore de fezes 3 nas bezerras COL-. A autora ressalta que os leucócitos colostrais, bem como outras substâncias do colostro, melhoraram a resistência do animal contra a infecção artificial à qual elas foram submetidas desde o estágio inicial e após a infecção. A autora levantou duas hipóteses sobre os mecanismos de defesa envolvendo as células do colostro: a primeira é de que os leucócitos do colostro podem ter atuado através de efeito antimicrobiano ou então, as células podem ter estimulado a resistência endógena da bezerra à infecção.

Langel et al. (2015) analisaram o escore de fezes de bezerras Holandesas e Jersey recém-nascidas, durante o primeiro mês, que receberam colostro fresco ou 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.

A elevada ocorrência de diarreia observada nas bezerras COL+ (50-70%) e COL- (44-78%) no primeiro mês de vida foi superior à prevalência (19,1%) e incidência (21,2%) reportados por outros pesquisadores (BARTELS et al., 2010; WINDEYER et al., 2014).

A elevada frequência de diarreia a partir do D2 nas bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) pode estar relacionada a diversos fatores de risco.

O alojamento e manejo ao qual as bezerras foram submetidas durante o período experimental pode ter influenciado na elevada ocorrência de diarreia. As bezerras eram transferidas das baias individuais e suspensas localizadas na maternidade para o bezerreiro aproximadamente seis horas após o parto. A estrutura do bezerreiro contempla uma área coberta de aproximadamente 1040 m², com a possibilidade de fechamento lateral com cortinas de tecido sintético, composto por 100% de polipropileno. No bezerreiro, as bezerras inicialmente foram alojadas em baias de madeira não suspensas onde era fornecido o leite de transição. Após três dias de vida, as bezerras foram novamente movidas para gaiolas suspensas de metal (1,2 m²), onde foram mantidas até 70 dias de vida. No período de aleitamento, as bezerras recebiam seis litros de leite sem antibióticos, em baldes, proveniente do rebanho.

As baias da maternidade eram higienizadas a cada cinco dias, sendo que uma vez por semana as paredes eram pintadas com uma mistura de cal com água. As baias de transição não suspensas e localizadas no bezerreiro também eram lavadas e desinfetadas com água e cal. O chão desta baia era um tapete de borracha, onde os funcionários colocavam cal e capim por cima. O chão e o teto do barracão eram higienizados antes da entrada das bezerras com água pressurizada e, em seguida, com cal. O cloro era usado como desinfetante para a limpeza dos baldes e mamadeiras. Nos tanques onde o leite era armazenado eram usados produtos de limpeza de ordenha: alcalino clorado e ácido.

O maior risco para a ocorrência da diarreia no manejo supra-descrito está relacionado à higienização das baias individuais, onde, apesar dos responsáveis pela fazenda terem consciência que o ideal seria a troca da cama e higienização a cada nova bezerra, o fato de não trocarem o material constantemente permite que haja contaminação entre os animais que são inseridos em ambiente já utilizado por outras bezerras.

Outros fatores de risco citados por McGuirk (2008) também podem ser mencionados considerando-se a realidade da fazenda onde este experimento foi realizado, tais como: contaminação oro-fecal pelo colostro ou ambiente; presença de outros animais no recinto como gatos; possível higienização não adequada de utensílios como mamadeiras, sondas esofágicas, bem como da limpeza do uniforme dos funcionários, como botas, macacões além da higiene das mãos dos cuidadores das bezerras.

Os principais patógenos causadores de diarreia em bezerros neonatos são *Escherichia coli*, Rotavírus, Coronavírus e *Cryptosporidium parvum*, identificados antes e após a primeira semana de vida (GULLIKSEN et al., 2009; BARTELS et al., 2010; CHO; YOON, 2013; MEGANCK et al., 2015). A identificação do patógeno causador da diarreia não foi contemplada no objetivo deste estudo, porém a maior ocorrência de diarreia entre 7 e 14 dias de vida aponta para maior possibilidade para agentes como Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* (MCGUIRK, 2008; CHO; YOON, 2013).

As vacas desta fazenda são vacinadas no período pré-parto para *Escherichia coli*, Rotavírus e Coronavírus, assim, a ocorrência de diarreia deveria ter sido menor do que os valores obtidos neste experimento. Meganck et al. (2015) mostraram que a vacinação materna reduz a frequência da diarreia neonatal de 39,9% para 14,3%.

Broncopneumonia foi observada em apenas uma bezerra do COL+ aos 14 dias de vida e COL- aos 28 dias de vida. Langel et al. (2015) também avaliaram o escore de broncopneumonia em bezerras que receberam colostro fresco e congelado. Estes autores detectaram maior ocorrência de escore respiratório aos 12 dias de vida no COL-, porém sem diferença estatística. O período onde foi detectada diferença estatística foi aos 38 dias, fase que não avaliamos neste experimento.

Durante todo o experimento foram observados 23 episódios de anemia. A anemia, predominantemente de acordo com a morfologia dos eritrócitos, foi a normocítica hipocrômica e o grupo mais anêmico foi o COL-. No caso da anemia da

inflamação, a absorção e distribuição das reservas de ferro não são suficientes para satisfazer a síntese de hemoglobina na medula óssea, mesmo tendo adequada ingestão de ferro na alimentação (GANZ, 2005). Acredita-se que a anemia encontrada no grupo COL- foi decorrente da resposta inflamatória causada a partir dos agentes responsáveis pela diarreia. Ganz (2005) afirmaram que este tipo de anemia pode ser um efeito colateral da resposta de defesa do hospedeiro para o controle da multiplicação bacteriana, considerando-se que o ferro é fundamental ao seu metabolismo.

O diferente *status* sanitário apresentado pelos grupos experimentais pode estar relacionado à ingestão e absorção de células maternas do colostro.

11.3 CORTISOL

O perfil da concentração do cortisol foi semelhante entre os grupos que receberam colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-). Ambos os grupos apresentaram pico de cortisol no D0, o que coincide com o momento pós-nascimento. O momento do parto é um período crítico e estressante, tanto para a vaca quanto para o bezerro, mesmo no parto eutócico, onde são observadas alterações endócrinas com a liberação de cortisol, noradrenalina e adrenalina. O momento do parto é bastante delicado, fazendo-se necessário um acompanhamento rigoroso durante as primeiras horas de vida (VANNUCCHI et al., 2015).

Uma das principais funções do cortisol é manter o equilíbrio da glicose do sangue. O aumento do cortisol serve, inicialmente, para prevenir a hipoglicemia durante estresse agudo ou prolongado como, por exemplo, do parto (BENFIELD et al., 2014).

Os altos níveis de cortisol que os bezerros produzem durante o parto permanecem elevados durante a primeira semana de vida, dependendo do oferecimento de condições ambientais e de manejo favoráveis à adaptação orgânica do recém-nascido. Ao nascer, bezerras necessitam passar por um processo de adaptação orgânica ao ambiente extrauterino. Algumas destas adaptações foram

avaliadas do nascimento ao desmame por Silva et al. (2016, no prelo)¹², observando-se que a primeira semana pós-natal foi marcada por importantes alterações fisiológicas inerentes à adaptação das funções cardiorrespiratórias, com algumas oscilações nos momentos seguintes, que foram atribuídas a oscilações climáticas do ambiente onde foram criadas. Os autores relataram impactos diretos do período de adaptação extrauterina nos parâmetros fisiológicos dos neonatos. A inadequada adaptação pode prolongar o estresse e os elevados níveis de cortisol.

Nesta pesquisa observou-se rápida diminuição dos níveis de cortisol já na primeira semana de vida. Esta adaptação em relação aos níveis de cortisol pode estar relacionada às baías de transição, pois provavelmente elas devem ter fornecido condições que otimizassem esta estabilidade orgânica pós-nascimento.

O acúmulo desses hormônios tem um efeito supressivo nas respostas imunes dos bezerros, afetando diretamente a resposta imune inata, causando diminuição na fagocitose e na atividade bactericida dos neutrófilos e macrófagos (BARRINGTON; PARISH, 2001; MOREIN et al., 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

11.4 HAPTOGLOBINA

As proteínas de fase aguda são um excelente marcador inflamatório utilizado para mensurar a inflamação. Dentre as proteínas de fase aguda, a haptoglobina é a proteína de fase aguda (PFA) mais indicada para a mensuração de inflamação em bovinos (MURRATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

As PFA são produzidas em resposta ao estímulo bacteriano e podem ser usadas como um indicador quantitativo da infecção, inflamação, lesão tecidual e estresse. A hp reduz o estresse pró-oxidativo e pró-inflamatório através da formação de complexos pela ligação da hp com a hemoglobina e retirando-a da circulação (MURRATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

Bezerros nascem com baixa concentração de hp, que podem estar ligadas ao sistema imunológico. Kruger et al. (2015) acreditam que o aumento da hp deve ser

---

¹² SILVA, B. T.; HENKLEN, A.; MARQUES, R. S.; OLIVEIRA, P. ;L.; LEITE, S. B. P.; NOVO, S. M. F.; BACCILI, C. C.; REIS, J. F.; GOMES, V. Vital parameters of Holstein calves from birth to weaning. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. [200-]. (no prelo).

visto como um evento positivo que indica inflamação nos primeiros dias de vida e consideram este fenômeno como algo normal e necessário para que haja a adaptação do animal ao ambiente extrauterino. Por outro lado, o que foi observado nesta pesquisa é que a hp aumentou apenas nos momentos em que as bezerras apresentaram diarreia, desta forma, contradizendo o autor supracitado e reafirmando a possibilidade de ela ser considerada um marcador inflamatório.

A haptoglobina das bezerras deste experimento apresentou perfil diferente entre os dois grupos, apesar da ausência de diferenças estatísticas. Foi possível observar que ambos começaram com baixos valores, tanto no nascimento quanto no D2. Já no D7 houve um acentuado aumento, atingindo o pico para o COL+ que logo em seguida decresceu de forma acentuada, observando-se valores próximos ao basal no D14. Já o COL- apresentou valores elevados em D7 e D14. Analisando os resultados, pode-se observar que os bezerros que ingeriram colostro sem células viáveis (COL-) apresentaram uma resposta inflamatória mais prolongada, principalmente nos momento em que houve diarreia. Pourjafar et al. (2011) também avaliaram a hp de bezerras durante o primeiro mês de vida e encontraram picos de hp coincidentes com o período em que elas apresentaram diarreia e provaram que a hp é um indicador confiável da severidade da diarreia em bezerras recém-nascidas. Possivelmente as citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina 6, estimularam o fígado para a produção de proteínas de fase aguda, dentre elas a haptoglobina (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). A haptoglobina é induzida pela citocina IL-6 e é caracterizada por ter um aumento na concentração sérica mais tardio, permanecendo elevado até a segunda semana (PETERSEN et al., 2004).

Os valores apresentados neste trabalho confirmam que foi possível mensurar a inflamação através da formação dos complexos da haptoglobina, pois o pico de concentração de hp coincide com os momentos em que as bezerras apresentaram diarreia.

11.5 FERRO

Os animais do grupo COL- apresentaram menores valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina, especialmente no D2. Este momento coincide com

acentuada diminuição nos valores de ferro sérico das bezerras que ingeriram colostro sem células viáveis.

Citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 e IL-6 são responsáveis pela indução da produção de proteínas de fase aguda, como por exemplo a hepcidina. Essa substância se liga com a porção férrica dos enterócitos, hepatócitos e macrófagos para bloquear a liberação de ferro armazenado nestas células. O efeito desta interação resulta na inibição da absorção de ferro da dieta e limita a exportação do mineral a partir do macrófago e hepatócito. O ferro é fundamental para as funções vitais das bactérias, tais como síntese de DNA e transporte de elétrons (NEMETH; GANZ, 2006).

11.6 PROPORÇÃO E FUNÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

O leucograma apresentou perfil ligeiramente diferenciado entre os grupos COL- e COL+. A oscilação observada no gráfico dos leucócitos totais e dos neutrófilos foi muito semelhante para o grupo COL+ e COL-, porém a queda do número de neutrófilos a partir do D7 foi mais intensa no COL+. Este fato pode ser associado com a maior eficiência dos neutrófilos das bezerras COL+ em migrar a partir dos episódios de diarreia (ZWAHLEN; ROTH, 1990).

Novo (2015) utilizou as mesmas bezerras deste experimento para o seu estudo. O alto número de células T gamma-delta ativadas presentes no grupo COL+ pode ser explicado pela resposta inflamatória mais rápida em comparação ao tempo que COL- levou para responder à inflamação. Acredita-se que os neutrófilos das bezerras que mamaram o colostro fresco tiveram maior agilidade em perceber o estímulo e se mover no sentido do tecido para combater a inflamação. As células T gamma-delta representam a principal fonte de IL-17, que é responsável pelo recrutamento para o tecido inflamado, e essa migração dos neutrófilos observada no D7 coincidiu com os episódios detectados de diarreia. (ROARK et al., 2008)

Foi possível observar diferença entre os momentos para os leucócitos totais do grupo COL- onde o D0 foi diferente do D28. Em relação ao número de neutrófilos no grupo COL+, o D0 foi diferente em relação ao D14, D21, D28.

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. O que observamos neste experimento foi que no momento em que o cortisol esteve alto (D0), a expressão de L-selectina na superfície dos neutrófilos estava ao redor de 85-90%. Talvez o efeito do cortisol sobre a expressão da L-selectina tenha sido mínimo considerando as condições de manejo oferecidas pelas bezerras.

A avaliação da influência das células do colostro sobre a proporção das subpopulações de leucócitos mononucleares do sangue das bezerras tem sido avaliada pela técnica de imunofenotipagem (REBER et al., 2006; REBER et al., 2008a,b; LANGE et al., 2015; NOVO, 2015), porém, pouco ainda se tem na literatura a respeito da proporção e função das células polimorfonucleares CH138⁺ expressando ou não da L-selectina.

O grupo COL+ apresentou queda brusca na proporção de PMN do D7 ao D21 que coincidiu com a redução na proporção de células expressando CD62L, provavelmente porque já haviam migrado para o tecido inflamado. Em contrapartida, o COL- apresentou queda lenta e gradual do PMN que coincidiu com maior expressão CD62L na circulação sanguínea devido ao lento processo de migração destas células aos tecidos.

A população CH138⁺CD62L⁺ é representada por granulócitos ativados. A ativação acentuada dos neutrófilos através da L-selectina ocorreu para que houvesse o mecanismo de adesão dos neutrófilos às células endoteliais dos vasos para a migração das células para o tecido através da diapedese. Este processo parece ter sido mais rápido nos bezerros que ingeriram colostro materno com células (COL+) observado no D14 em relação ao COL- (D21). Esta hipótese é reforçada pelo perfil dos valores absolutos de neutrófilos determinados pelo leucograma, no qual o COL+ apresentou queda brusca do D7 ao D14, enquanto o COL- apresentou queda lenta e gradual no decorrer do estudo.

A população CH138⁺CD62L⁻ circulante apresentou tendência para diferentes perfis, observando-se maiores proporções no COL+ em relação ao COL-. Este fato pode indicar diferenças na intensidade da diarreia apresentada pelos dois grupos,

considerando que o COL- apresentou maior frequência de escore 3. Os granulócitos CH138⁺ das bezerras COL- estavam sendo recrutados em quase totalidade para a defesa contra a infecção. O COL+ apresentou um pouco mais de neutrófilos circulantes sem que estivessem sendo recrutados ao tecido, mais um sinal que comprova que estes animais estiveram mais sadios e menos debilitados, necessitando um pouco menos da atividade.

Reber et al. (2006) também não encontraram diferenças entre os grupos COL+ e COL- para a expressão de L-selectina das células mononucleares sanguíneas. Os autores acreditam que a L-selectina desempenha um papel menos importante na migração de células através da parede do intestino devido ao menor fluxo dos vasos na região intestinal.

Langel et al. (2015) observaram que a expressão de L-selectina foi maior nos linfócitos no grupo acelular. Os autores acreditam que possa ter havido expressão do CD62-L na superfície celular em resposta a antígenos ou estímulo de citocinas.

Gomes et al. (2014) avaliaram a influência do colostro no desenvolvimento da resposta imune inata de bezerros recém-nascidos pela imunofenotipagem do CH138⁺ das células sanguíneas. Os autores observaram que as proporções de neutrófilos CH138⁺ estiveram maiores no nascimento, e permaneceram altas até o 15º dia de vida. Este perfil se assemelhou ao encontrado nesta pesquisa para CH138⁺CD62L⁺ os quais também permaneceram altos praticamente nos mesmos períodos, tendo baixa nos valores no 14º dia. Estas alterações na população de CH138⁺ podem estar relacionadas ao estresse do nascimento e neste caso não foram relacionadas a processos inflamatórios, pois os autores detectaram baixos ou indetectáveis níveis de citocinas pró-inflamatórias.

A partir dos dados apresentados para o perfil de COL+ e COL- foi possível notar uma maior e mais rápida resposta nas bezerras COL+, observando maior dificuldade do COL- em reagir aos desafios. A hipótese que levantamos para justificar esse achado é de que as bezerras COL+ apresentaram uma maior resposta Th17 através do estímulo das células gamma-delta. Possivelmente, o que possa ter ocorrido é que ao ingerir o colostro com células viáveis, as mesmas foram absorvidas pelo epitélio intestinal. Ao nascimento, ambos os grupos foram desafiados pelos microrganismos do meio ambiente. Desta forma, os patógenos que adentraram o organismo e estiveram presentes na parede do intestino foram fagocitados por células dendríticas e macrófagos, seguiram aos linfonodos

mesentéricos e placas de *Peyer* onde estimularam a expansão clonal de linfócitos T. Esta expansão clonal estimulou a produção de células T gamma-delta que, por sua vez, ao liberarem a citocina IL-17, atraíram mais neutrófilos para combater a infecção no foco da inflamação observados no COL-.

Esta hipótese pode ser sustentada pelos achados de NOVO (2015) que, ao utilizar as mesmas bezerras para o experimento e mensurar a IL-17, obteve que as células T gamma-delta das bezerras COL+ apresentaram produção precoce da citocina, recrutando neutrófilos de forma mais ágil. Shibata et al. (2007) analisaram a produção de IL-17 por células T gamma-delta em ratos infectados com *E. coli* e demonstraram que estas células são importantes para a resposta a estímulos bacterianos.

Para avaliar a função dos neutrófilos cabe explicar o motivo pelo qual não foi utilizado o marcador CH138⁺ para definir o local exato onde os neutrófilos estavam dentro do *gate* de polimorfonucleares. Em experimento anterior da equipe, SILVA (2014) avaliou a fagocitose e produção de *burst* oxidativo das células polimorfonucleares do sangue de vacas no periparto pela mesma técnica de fagocitose de *S. aureus* e *E. coli* desenvolvida neste experimento. Neste trabalho, SILVA (2014) observou que a maioria das células dentro do *gate* PMN eram células CH138⁺ (96%).

A metodologia empregada para a mensuração da fagocitose e produção de radicais livres foi testada e comprovada por Kampen et al. (2004) que, dentre cinco metodologias testadas, concluiu que a citometria de fluxo é ideal por ser considerada relativamente fácil, por usar uma pequena quantidade de sangue, e por permitir isolamento da população celular de interesse.

Os PMN apresentaram perfis diferentes em ambos os grupos, o que permitiu a detecção de algumas diferenças ou tendências estatísticas. Os neutrófilos do COL- foram mais reativos durante praticamente todo o período estudado, detectando-se tendência no D14 e diferença no D21 entre grupos.

O índice de fagocitose realizada pelas células polimorfonucleares, estimulados com *S. aureus* e *Escherichia coli*, foram semelhantes entre os grupos de bezerras que ingeriram colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-), observando-se pico máximo no D2. Em contrapartida, a intensidade da fagocitose foi maior no COL- que apresentou valores crescentes do D7 ao D14 e queda brusca em D21. Diferença estatística foi comprovada no D7 para a *E.coli*, onde o COL-

apresentou maior intensidade de fluorescência. Este fato aponta que os PMN do grupo COL- apresentavam maior quantidade de bactérias em seu interior e maior atividade celular.

O perfil apresentado para a produção de peróxido de hidrogênio foi diferente entre os grupos, apesar das poucas diferenças estatísticas obtidas. A proporção de células produzindo o H_2O_2 basal foi maior no COL- no D14, entretanto as bezerras que ingeriram colostro com células (COL+) apresentaram maior intensidade de fluorescência no D21. Estes achados indicam que as células PMN das bezerras COL+ possuem maior capacidade para produzir peróxido de hidrogênio.

A proporção de células PMN produzindo H_2O_2 após a estimulação com o *S.aureus* e *E.coli* foi constante no COL- e sofreram variações no COL+ observando-se pico máximo em D7 e redução entre D14 e D28. Este fato pode apontar para um constante desafio no COL- ao longo do estudo e redução da função dos PMN no COL+ devido ao melhor *status* sanitário dessas bezerras.

A intensidade da fluorescência obtida para a produção de H_2O_2 quando estimuladas com *S.aureus* e *E.coli* também foi mais intensa no COL+ em relação ao COL- apesar da ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ao longo do estudo.

Batista et al. (2015) avaliaram o sistema imune inato das bezerras através da fagocitose e produção de radicais livres por fagócitos $CH138^+$ e $CD14^+$ estimulados com *S. aureus* e *E. coli* durante os primeiros 90 dias de vida. Os autores encontraram maior intensidade de fagocitose de *S. aureus* na primeira semana. Na presente pesquisa, a maior intensidade foi observada na primeira semana de vida para o COL+ e na segunda semana para o COL-. Possivelmente o perfil se assemelhou ao encontrado no COL+ devido ao melhor *status* sanitário desse grupo.

O índice de fagocitose (%) dos granulócitos apresentou semelhança entre os grupos, entretanto a intensidade da fluorescência foi mais expressiva no COL-. Em contrapartida, o COL+ demonstrou maior habilidade em produzir H_2O_2 . Desta forma, a grande quantidade de bactérias no interior dos granulócitos das bezerras que ingeriram colostro sem células viáveis pode ser explicada pela menor eficiência na produção de peróxido de hidrogênio.

12 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir:

- (a) As células do colostro influenciaram no perfil sanitário apresentado pelas bezerras, observando-se maior intensidade de diarreias, menores teores de ferro sérico e anemias no grupo que recebeu colostro congelado;
- (b) A migração dos granulócitos sanguíneos foi mais rápida e intensa no COL+ em relação às bezerras que receberam colostro congelado (COL-), após exposição natural aos patógenos causadores de diarreia;
- (c) O índice de fagocitose (%) dos granulócitos apresentou semelhança entre os grupos, entretanto a intensidade da fluorescência foi mais intensa no COL-. Em contrapartida, o COL+ demonstrou maior habilidade em produzir H_2O_2 .

REFERÊNCIAS

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 in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 162–169, 2010.

BARTIER, A. L.; WINDEYER, M. C.; DOEPEL, L. Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1878-1884, 2015.

BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M.G.; BERTAGNON, H. G.; GOMES, R. C.; SANTOS, K. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Evolution of phagocytic function in monocytes and neutrophils blood cells of healthy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8882-8888, 2015.

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, 2012.

BENFIELD, R. D.; NEWTON, E. R.; TANNER, C. J.; HEITKEMPER, M. M. Cortisol as a biomarker of stress in term human labor: physiological and methodological issues. **Biological Research for Nursing**, v.16, p. 64–71, 2014.

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.

BURTON, J. L.; KEHRLI JR.; M. E.; KAPIL S.; HORST R. L. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, p. 317–325, 1995.

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 colostrum IgG concentration in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, p. 761-766, 2008.

CHO, YONG-IL.; YOON, KYOUNG-JIN. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal Veterinary Science**, v. 15 n.1, p. 1-17, 2013.

CORTESE, V. S. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v. 25, n.1, 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.

DIRKSEN, G; GRÜNDER, H D; STÖBER, M R. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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.

GANZ, T. Hepcidin: A regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 171–182, 2005.

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

GOMES, V.; BACCILI, C. C.; BALDACIM, V. A. P.; MADUREIRA, K. M.; GUILLOUX, A. G. A.; POZZI, C. R.; GOMES, C. O. M. S. Development of the innate immune response and influence of colostrum suckling in calves. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 9, n. 2, p. 77-83, 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.

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.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. C. ; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, p. 621–636, 1990.

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

KRUGER, L.; BEITZ, D. C.; STUART, R. L.; STABEL, J. R. Early Inflammation Disorder in Neonatal Calves. **Animal Industry Report**, v. 661, n. 1, p. 32-42, 2015.

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.

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.

McDONALD, J.S.; ANDERSON, A.J. Total and diferential somatic cell counts in secretions from no ninfected bovine mammary glands: the peripartum period. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1.366-1.368, 1981.

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.

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.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinary Scandinavica**, p. 56-75, 2014.

MEGANCK, V.; OPSOMER, G.; PIEPERS, S.; COX, E.; GODDEERIS, B. M. Maternal colostral leukocytes appear to enhance cell-mediated recall response, but inhibit humoral recall response in prime–boost vaccinated calves. **Journal of Reproductive Immunology**, 2015. DOI: /dx.doi.org/doi:10.1016/j.jri.2015.11.004

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

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

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **The Veterinary Journal**. v.168, p. 28–40, 2004.

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.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **The Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 323-342, 2006.

NOCEK, J. E.; BRAUND D. G.; WARNER, R. G. Influence of Neonatal Colostrum Administration, Immunoglobulin, and Continued Feeding of Colostrum on Calf Gain, Health, and Serum Protein. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, 1984.

NOVO, S. **Efeito dos leucócitos do colostro materno na resposta imune de bezerros recém-nascidos**. São Paulo, 2015. 128 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

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.

PETERSEN, H.; NIELSEN, J.; MIKAEL, P.; HEEGAARD, H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research, BioMed Central**, v. 35, n. 2, p.163-187, 2004.

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

POURJAFAR, M.; BADIEI, K.; NAZIFI, S. NAGHIB, S. M. Acute phase response in Holstein dairy calves affected with diarrhoea. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.14, n. 3, p. 142–149, 2011.

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 colostral 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 colostral 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.; 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.

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.

STIELER, A.; BERNARDO, B. S.; DONOVAN, G. A. Neutrophil and Monocyte Function in Neonatal Dairy Calves Fed Fresh or Frozen Colostrum. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 10, n. 4, 2012.

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.

VANNUCHCHI, C. I.; RODRIGUES, J. A.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A.; NICHI, M.; Association between birth conditions and glucose and cortisol profiles of periparturient dairy cows and neonatal calves. **Veterinary Record**, 2015, doi: 10.1136/vr.102862.

WINDEYER, M. C.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S. M.; HODGINS, D. C.; LISSEMORE, K. D.; LEBLANC, S. J. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, n. 2, p. 231-240, 2013.

ZWAHLEN, R. D.; ROTH, D. R. Chemotactic Competence of Neutrophils from Neonatal calves: Functional Comparison with Neutrophils from Adult Cattle. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 109-123, 1990.

13 CONCLUSÃO GERAL

A administração de colostro com (COL+) e sem células viáveis (COL-) não influenciou na colonização da microbiota do intestino, porém a maior habilidade de migração e produção de peróxido de hidrogênio pelos granulócitos sanguíneos das bezerras COL+ pode justificar o melhor *status* sanitário desses animais, considerando-se que as bezerras que ingeriram colostro congelado apresentaram maior intensidade da diarreia e anemia do processos inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ADKINS, M. L. Ecology of transferred maternal Staphylococci and neonatal Staphylococcal immunity. In: SCIENCE OF VETERINARY MEDICINE SYMPOSIUM, 2014, Georgia: University of Georgia, 2014.
- AUJLA, S. J.; DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th17 cells and mucosal host defense. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 377-382, 2007.
- BARTIER, A. L.; WINDEYER, M. C.; DOEPEL, L. Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1878-1884, 2015.
- BIELMANN, V.; GILLAN, J.; PERKINS, N. R.; SKIDMORE, A. L.; GODDEN, S.; LESLI, K. E. An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 93, p. 3713-3721, 2010.
- BRANDTZAEG, P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2, p. 8-15, 2010.
- CHIGERWE, M.; TYLER, J. W.; MIDDLETON, J.R, SAPAIN, 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 North America: food animal practice**, v. 25, n.1, 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.
- GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v. 24, p. 19- 39, 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.
- GONZALEZ, D. D.; RIMONDI, A.; AGUIRREBURUALDE, M. S. P.; MOZGOVO J. M.; BELLIDO, D.; WIGDOROVITZ, A.; DUS SANTOS, M. J. Quantitation of cytokine gene expression by real time PCR in bovine milk and colostrum cells from cows immunized with a bovine rotavirus VP6 experimental vaccine. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 703-708, 2013.

IVANOV, I. I.; LITTIMAN, D. R. Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p.106–114, 2011.

KEHOE, S. I.; JAYARAO, B. M.; HEINRICHS, A. J. A Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms. **Journal of dairy science**, v.90, n. 9, p. 4108-4116, 2007.

KOBOZIEV, I.; WEBB, C. R.; FURR, W. B. K.; GRISHAM, M. B. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine** **G8**, p. 122-133, 2014.

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.

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.

LARSON, B. L.; HEARY, H. L.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 665-667, 1980.

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.

MANDYLA, H.; XANTHOU, M.; MARVELIAS, C.; BAUM, D.; MATSANIOTIS, N. Antibody dependent cytotoxicity of human colostrum phagocytes. **Pediatrics Research**, v.16, p. 995-999, 1982.

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

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

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.

MEGANCK, V.; OPSOMER, G.; PIEPERS, S.; COX, E.; GODDEERIS, B. M. Maternal colostral leukocytes appear to enhance cell-mediated recall response, but inhibit humoral recall response in prime–boost vaccinated calves. **Journal of Reproductive Immunology**, 2015. DOI: /dx.doi.org/doi:10.1016/j.jri.2015.11.004

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v, 3, p. 331–341, 2003.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. **National dairy health evaluation project. Dairy heifer morbidity, mortality, and health management focusing on preweaned heifers**. Ft. Collins (CO): USDA-APHIS Veterinary Services, 1996.

PAULA, M. R. **Avaliação da saúde e desempenho de bezerros leiteiros recebendo suplemento de colostro associado ao colostro materno**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escolar Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

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. 724-732, 2007.

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. **The influence of the colostral environment on the capacity of maternal leucocytes to cross intestinal epithelium and modulate the neonatal immune system**. (2000) 103 f. (PhD Dissertation) Paper 267. South Dakota State University, 2000.

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

REITER, B. Review of the progress of dairy Science: antimicrobial system in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 45, p. 131-147, 1978.

RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends in Immunology**, v.32, n. 6, p. 256-264, 2011.

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.

RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostral 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.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.134, p. 577–594, 2008.

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.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, I. K.; SCHOENBERGER, P. S. In Vitro Growth of Mastitis Associated Streptococci in Bovine Mammary Secretions. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 9, p. 2337-2346, 1985.

TUBOLY, S.; BERNATH, S.; GLAVITS, R.; KOVACS, A.; MEGYERI, Z. Intestinal absorption of colostral lymphocytes in newborn lambs and their role in the development of the immune status. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 43, p. 105-115, 1995.

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

VERHASSELT, V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 623-630, 2010.

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.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VANMETRE, D. C.; HOSTETLER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. **Jornal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p. 569–577, 2000.

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.

ANEXOS

ANEXO A –TSA (Tryptic Soy Agar)

Meio de agar TSA ..... 16 g
 Água destilada q.s.p..... 400 mL

Colocar em um *Erlenmeyer* o pó e água destilada no fogo e homogeneizar até dissolver completamente. Autoclavar por 15 minutos a 121°C, esperar esfriar e distribuir nas placas.

ANEXO B – Agar MacConkey

Meio de agar *MacConkey* ..... 48 g
 Água destilada q.s.p..... 800 mL

Colocar em um *Erlenmeyer* o pó e água destilada no fogo e homogeneizar até dissolver completamente. Autoclavar por 15 minutos a 121°C, esperar esfriar e distribuir nas placas.

ANEXO C – Agar Sangue de carneiro 5%

Meio de agar sangue ..... 32 g
 Água destilada q.s.p..... 800 mL

Colocar em um *Erlenmeyer* o pó e água destilada no fogo e homogeneizar até dissolver completamente. Autoclavar por 15 minutos a 121°C, esperar esfriar até aproximadamente 50°C e adicionar o sangue ovino 5%-8% desfibrinado e estéril. Em seguida, distribuir nas placas.

ANEXO D – Salmonella-Shigella (SS)

Meio *Salmonella-Shigella*..... 6 g
 Água destilada q.s.p..... 100 mL

Colocar em um *Erlenmeyer* o pó e água destilada no fogo e homogeneizar até dissolver completamente. Autoclavar por 15 minutos a 121°C, esperar esfriar e distribuir nas placas.

ANEXO E – Tetracionato

Meio Tetracionato ..... 4,60 g
 Água destilada q.s.p..... 100 mL

Colocar em um *Erlenmeyer* o pó e água destilada no fogo e homogeneizar até dissolver completamente. Aquecer até ferver e esperar esfriar até aproximadamente 60°C. Em seguida, distribuir 10mL da solução em tubos estéreis de vidro compridos com tampa de rosca.

ANEXO F – Iodo-Iodeto

Cristais de Iodo ..... 6 g
 Iodeto de Potássio ..... 5 g
 Água destilada q.s.p..... 20 mL

Misturar e armazenar em frasco de vidro âmbar.

ANEXO G – Preparo da solução 100mM EDTA

EDTA sal dissódico ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ 372,24mM).....	3,722g
Água destilada.....	100mL

Homogeneizar até dissolver completamente o sal e colocar autoclave

ANEXO H – PBS 10x (Concentrado)

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	26,79g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	4,14g
NaCl.....	82g
Água destilada.....	1000mL

PBS uso: 1 PBS 10x: 9 de água destilada

ANEXO I – Soluções utilizadas no protocolo de Fagocitose e Produção de H_2O_2

DCFH – Solução de estoque – 25 mM

Pó comercial	24,35 mg
Etanol	2 mL
Proteger da luz – Manter em freezer -20°C	

DCFH – Solução de uso

Solução de estoque	100 μ L
PBS	8,2 mL

Adaptar a quantidade da solução a ser preparada, para a quantidade necessária apenas para o uso imediato, respeitando as mesmas proporções.

EDTA 3 mM

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ -PM 372,24 g/mol)	1,12g
PBS (1x)	1000 mL
Manter refrigerado.	

ANEXO J – PBS 2x (Concentrado)

PBS 10x Concentrado (Anexo H)	200mL
Água Milli Q.....	800mL