

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção**



Dissertação

**Parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros  
submetidos a administração do imunoestimulante pegbovigrastim**

**Fernanda Kegles**

Pelotas, 2018

**Fernanda Kegles**

**Parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros submetidos a administração do imunostimulante pegbovigrastim**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do Conhecimento: Bioensaios).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Schmitt

Dra. Josiane de Oliveira Feijó

Pelotas, 2018

**Dados de catalogação na fonte:**

Dafne Silva de Freitas - CRB: 10/2175

K24p Kegles, Fernanda

Parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros submetidos a administração do imunostimulante pegbovigrastim / Fernanda Kegles ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, orientador ; Eduardo Schmitt, Josiane de Oliveira Feijó, coorientadores. Pelotas, 2018.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Bezerro leiteiro. 2. Imunostimulante. 3. Lipopolissacarídeo. I. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, orient. II. Schmitt, Eduardo, coorient. III. Feijó, Josiane de Oliveira, coorient. IV. Título.

Fernanda Kegles

Parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros  
submetidos a administração do imunostimulante pegbovigrastim

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção,  
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/01/2018

Banca examinadora:

  
.....  
Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino (Orientador)

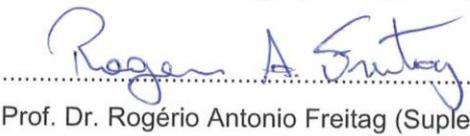
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

  
.....  
Prof. Dr. Cassio Cassal Brauner

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

  
.....  
Prof. Dr. Augusto Schneider

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

  
.....  
Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag (Suplente)

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Dedico este trabalho ao meu avô. Com toda  
minha gratidão, honra e saudade.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a minha mãe, Noris Regina Kegles Teixeira, por tudo que fez por mim, por ter sido além de minha mãe, o meu pai. Por ser essa mulher batalhadora e maravilhosa, que buscou sempre me dar a melhor educação, além do seu carinho, amor e dedicação;

À minha avó, Nelly Kegles Teixeira, por todo seu afeto e incentivo;

Ao meu avô, Wilmar Teixeira, que me deixou no final dessa trajetória, mas agradeço imensamente por todos os momentos vividos, e ter tido a oportunidade de cuidar dele;

Ao meu namorado, Uriel Secco Londero, por toda paciência, ajuda, amor e companheirismo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino, pela oportunidade e orientação. Por incentivar novos conhecimentos, e ser um exemplo profissional e pessoal;

As minhas queridas amigas da farmácia, por toda amizade e companheirismo, por me fazerem rir e acreditar nos momentos difíceis;

Aos amigos que fiz no Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), pela amizade, paciência e conhecimentos trocados;

À minha família e amigos, por terem me apoiado com tanto amor e carinho;

Meu muito obrigada!

*“... todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e acima de tudo, com bom senso e sensibilidade.*

*... não se curvem às críticas insensatas, descomedidas, de pessoas que nem sempre têm consciência do seu momento.*

*Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão sempre vencedores”.*

*M. Gandhi*

## Resumo

KEGLES, Fernanda. **Parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros submetidos a administração do imunostimulante pegbovigrastim**. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Um dos principais limitantes da produção leiteira de bovinos ocorre na fase de cria, devido à alta ocorrência de doenças, principalmente do trato gastrointestinal e respiratório. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da administração do imunostimulante pegbovigrastim sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros, e sua resposta frente a desafio com lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, foram realizados dois experimentos, no primeiro utilizou-se 20 bezerras recém-nascidas da raça Holandês, divididas em dois grupos: grupo Imrestor (IMR, n = 10), que recebeu uma administração subcutânea (SC) de 25 µg/kg de peso vivo de pegbovigrastim, e grupo Controle (CTR, n = 10) que recebeu uma administração de placebo de cloreto de sódio 0,9%, ambas no décimo dia de vida dos animais. Coletas de sangue foram realizadas nos dias 10, 12 e 14, em relação ao nascimento, para analisar os parâmetros bioquímicos e hematológicos, e também foram realizadas avaliações zootécnicas nos dias 0, 7, 14, 21 e 60 em relação ao nascimento. Observa-se que há um aumento no número de leucócitos totais ( $P < 0,0001$ ) no grupo IMR nos dias 12 e 14 em comparação ao grupo CTR, assim como a contagem de neutrófilos segmentados ( $P < 0,0001$ ), neutrófilos bastonetes ( $P < 0,0001$ ) e monócitos ( $P = 0,0002$ ). Não foi observado diferenças nos demais parâmetros hematológicos ( $P < 0,05$ ), bioquímicos ( $P < 0,05$ ) e zootécnicos ( $P < 0,05$ ) analisados. Já no segundo experimento, foram utilizados 20 bezerros da raça Holandês até sessenta dias de vida, separados em quatro grupos: grupo 1 (LPS, n = 5) que recebeu uma aplicação única endovenosa (EV) de LPS de *Escherichia coli* no dia 0, na dose de 0,25 µg/kg de peso vivo; grupo 2 (IMR, n = 5), que recebeu uma aplicação SC de pegbovigrastim no dia 1 em relação a aplicação do LPS, na dose de 25 µg/kg de peso vivo; grupo 3 (IMR+LPS, n = 5), que recebeu uma aplicação de LPS na dose de 0,25 µg/kg no dia 0, e 25 µg/kg de peso vivo de pegbovigrastim no dia 1; e grupo 4 (CTR, n = 5), que recebeu uma dose placebo de cloreto de sódio 0,9% por via EV no dia 0 e outra dose SC no dia 1. Para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, foram realizadas coletas de sangue nos dias -1, 0, 1, 2, 3, 4, 8, 14 e 21 em relação a aplicação de LPS. Observa-se um aumento no número de leucócitos totais ( $P < 0,0001$ ) nos grupos IMR, IMR+LPS e LPS, sendo que o grupo IMR manteve-se com o maior número de células desde o dia 2 até o dia 21. Os níveis de paraoxonase 1 ( $P = 0,02$ ) foram maiores no grupo IMR em comparação a todos os outros. A administração de IMR não alterou metabólitos fundamentais para o funcionamento hepático, renal e proteico dos bezerros ( $P > 0,05$ ). Os estudos demonstraram que a administração de pegbovigrastim aumenta o número de neutrófilos circulantes, sem afetar parâmetros bioquímicos e zootécnicos dos animais.

**Palavras-chave:** bezerro leiteiro, imunostimulante, lipopolissacarídeo.

## Abstract

KEGLES, Fernanda. **Hematological, biochemical and zootechnical parameters of dairy calves submitted to the administration of the immunostimulant pegbovigrastim.** 2018. 64f. Dissertation (Master Degree em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

One of the main limitations of bovine milk production occurs in the calf stage, due to the high occurrence of diseases, mainly of the gastrointestinal and respiratory tract. Therefore, this study aimed to evaluate the administration of the pegbovigrastim immunostimulant on the hematological parameter, biochemical and zootechnical parameters of dairy calves, and its response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. In order to do this, two experiments were carried out. Twenty newborn Holstein calves were divided into two groups: Imrestor group (IMR, n = 10) with subcutaneous administration (SC) of 25 µg/kg of live weight of pegbovigrastim and Control group (CTR, n = 10) receiving a placebo (0.9% saline solution) administration, both on the 10th day of life of the animals. Blood samples were collected on days 10, 12 and 14 in relation to the birth to analyze the biochemical and hematological parameters, and zootechnical evaluations were performed on days 0, 7, 14, 21 and 60 of age. It was observed that there was an increase in the number of total leukocytes ( $P < 0,0001$ ) in the IMR group on days 12 and 14 in comparison to the CTR group, as well as the counts of segmented neutrophils ( $P < 0,0001$ ), band neutrophils ( $P < 0,0001$ ), and monocytes ( $P = 0,0002$ ). No differences were observed in the other haematological ( $P < 0,05$ ), biochemical ( $P < 0,05$ ) and zootechnical ( $P < 0,05$ ) parameters analyzed. In the second experiment, 20 Holstein calves were used up to sixty days old, divided into four groups: group 1 (LPS, n = 5) receiving a single intravenous application of *Escherichia coli* LPS on day 0, at a dose of 0.25 µg/kg body weight; group 2 (IMR, n = 5), who received an SC application of pegbovigrastim on day 1 in relation to the LPS application at a dose of 25 µg/kg body weight; group 3 (IMR + LPS, n = 5), which received an LPS application at a dose of 0.25 µg/kg on day 0, and 25 µg/kg of live weight of pegbovigrastim on day 1; and group 4 (CTR, n = 5), who received a placebo dose of 0.9% sodium chloride via EV on day 0 and another SC dose on day 1. For the analysis of biochemical and hematological parameters, blood samples were collected on days -1, 0, 1, 2, 3, 4, 8, 14 and 21 which relate to LPS challenge. An increase in the number of total leukocytes ( $P < 0,0001$ ) was observed in the IMR, IMR + LPS and LPS groups, and the IMR group remained with the highest number of cells from day 2 to day 21. The levels of paraoxonase 1 ( $P = 0,02$ ) were higher in the IMR group compared to all others. The administration of IMR did not alter metabolic parameters that were fundamental for the hepatic, renal and proteic functioning of the calves ( $P > 0,05$ ). Studies have shown that the administration of pegbovigrastim increases the number of circulating neutrophils, without affecting biochemical and zootechnical parameters of the animals.

**Key-words:** dairy calves, immunostimulant, lipopolysaccharide.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

bG-CSF	<i>Bovine Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos Bovino
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> Grupamento de Diferenciação
CSF	<i>Colony-Stimulating Factor</i> Fator Estimulador de Colônias
DNAc	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico Complementar
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LBP	<i>Lipopolysaccharide-Binding Protein</i> Proteína Ligante de Lipopolissacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MD	Proteína Mielóide Diferenciadora
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PEG	Polietilenoglicol
PMN	Polimorfonuclear
SC	Subcutâneo
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i> Receptor do Tipo <i>Toll</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> Fator de Necrose Tumoral
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Objetivo Geral</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	15
<b>3 Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>16</b>
3.1 Bovinocultura Leiteira .....	16
3.2 Bezerros .....	17
3.2.1 Diarreia Neonatal Bovina .....	17
3.2.2 Broncopneumonia .....	18
3.3 Sistema Imunológico de Bezerros Neonatos .....	19
3.3.1 Imunidade Passiva .....	19
3.3.2 Imunidade Inata e Adquirida .....	20
3.3.2.1 Neutrófilos .....	21
3.3.2.2 Lipopolissacarídeo .....	22
3.4 Fatores Estimuladores de Colônias .....	22
3.4.1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos .....	23
3.4.1.1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos Bovinos .....	23
3.4.1.1.1 Pegbovigrastim .....	24
<b>4 Artigo</b> .....	<b>25</b>
<b>5 Conclusão</b> .....	<b>55</b>
<b>Referências</b> .....	<b>56</b>
<b>Anexo</b> .....	<b>63</b>

## 1 Introdução

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro (Queiroz et al., 2010), sendo a quinta maior potência na produção leiteira mundial (USDA, 2016). Contudo, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), a pecuária leiteira apresentou uma queda no número de vacas ordenhadas, porém apresentou um aumento na produção média por animal. Apesar disso, enquanto as outras regiões tiveram um declínio ou se mantiveram constantes desde 2014, a região Sul do país obteve um aumento na produção de leite, sendo responsável por 37,0% do total nacional (IBGE, 2016).

Nesse contexto, a saúde do animal no início da vida é uma condição prévia para o desenvolvimento e, conseqüentemente, uma alta produtividade no futuro (Ayrle et al., 2016). Entretanto, um dos principais limitantes da produção leiteira de bovinos ocorre na fase de cria, devido à alta ocorrência de doenças, principalmente do trato gastrointestinal e respiratório, sendo as mais incidentes a diarreia neonatal bovina e a broncopneumonia, respectivamente (Windeyer et al., 2014). Durante essa fase, o sistema imune dos bezerros ainda é imaturo e o contato com agentes patogênicos geralmente resulta em alta morbidade e mortalidade desses animais (Ayrle et al., 2016).

A diarreia neonatal bovina é um dos maiores problemas de saúde nas primeiras semanas de vida do animal, responsável por mais de 50% dos óbitos de neonatos (Batista et al., 2008; Azizzadeh et al., 2012). É uma doença multifatorial, causada tanto por fatores infecciosos, como bactérias, vírus e protozoários, quanto não infecciosos (Bartels et al., 2010; Cho e Yoon, 2014). Os principais patógenos envolvidos são a *Escherichia coli*, coronavírus, *Cryptosporidium parvum* e o rotavírus (Meganck et al., 2015); enquanto que, o manejo de colostro inadequado e, conseqüentemente, baixo nível de imunoglobulinas (Igs) nos bezerros, o número de partos da vaca, superlotação dos alojamentos, altas temperaturas, qualidade da dieta e os cuidados dos criadores, são os principais fatores não infecciosos envolvidos nessa enfermidade (Radostits et al., 2002).

Um dos principais agentes bacterianos causadores de diarreia, a *Escherichia coli*, é a espécie predominante entre as bactérias intestinais anaeróbicas facultativas e não esporuladas (Santurio et al., 2011). Dentre os fatores de patogenicidade, encontram-se as fímbrias, responsáveis pela aderência às células do hospedeiro (Guimarães De Brito et al., 2004), e a liberação de exotoxinas e endotoxinas, como os

lipopolissacarídeos (LPSs) de membrana (Murphy, 2014). O LPS é um componente importante da membrana celular externa de bactérias gram-negativas e é capaz de induzir inflamação e respostas da fase aguda (Hang et al., 2016; Zhang e White, 2017). A exposição sistêmica à essa molécula foi associada a uma série de doenças comuns ao bovino, como a mastite, laminite, acidose ruminal e a diarreia (Jacobsen et al., 2004).

Já as doenças respiratórias, em especial a broncopneumonia, apresentam-se principalmente após as quatro semanas de vida, sendo responsável por cerca de 15% das mortes nesse período (Batista et al., 2008; Azzadeh et al., 2012). Assim como na diarreia, a broncopneumonia também apresenta uma etiologia multifatorial, sendo causada por vírus, bactérias e micoplasma, aliados a uma falha na transferência de imunidade passiva ou a um estresse contínuo causado ao animal (Bowland e Shewen, 2000; Snowden et al., 2006; Gonçalves et al., 2011).

O sistema imunológico é responsável pela defesa contra microrganismos infecciosos, sendo mediadas pelas barreiras físicas, que evitam a penetração de microrganismos invasores; a imunidade inata, que fornece uma rápida proteção inicial; e a imunidade adquirida, responsável por uma imunidade efetiva mais duradoura. No entanto, o sistema imune dos bovinos ao nascimento não está totalmente desenvolvido (Cortese, 2009; Tizard, 2009). Apesar de haver um grande número de células fagocitárias, a função dessas células é diminuída, devido a maturação do sistema imune em mamíferos ser lenta (Cortese, 2009; Gomes et al., 2017).

O sistema imune dos bezerros recém-nascidos é incapaz de produzir Igs suficientes para combater desafios do ambiente (Goff, 2006; Coelho, 2009), além disso, as Igs maternas não atravessam a placenta do bovino. Desse modo, o consumo do colostro nas primeiras horas de vida determina o estado da imunidade passiva e influencia o estado nutricional, metabólico e endócrino dos mesmos (Blum, 2006; Kindlein et al., 2017), já que representa uma importante fonte de Igs, além de conter citocinas e leucócitos maternos (Gomes et al., 2017; Gonzalez e Santos, 2017). Por isso, o uso de estratégias que maximizem a resposta imune frente a antígenos pode ser fundamental para o correto desenvolvimento de bezerros leiteiros, como o uso de imunoestimulantes.

Alguns dos imunoestimulantes utilizados são os fatores estimuladores de colônias (CSFs), que são um grupo de citocinas hematopoiéticas fundamentais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células progenitoras da medula óssea

(Heidari et al., 2001; Canning et al., 2017). A produção e diferenciação dessas células é regulada pelo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), que além do seu efeito na hematopoiese, aumenta as funções dos neutrófilos contra microrganismos patogênicos e células tumorais mediadas por anticorpos dependentes de células mediadas por citotoxicidade (Heidari et al., 2001; Bendall e Bradstock, 2014; Canning et al., 2017). Os neutrófilos são as principais células imunes de combate aos patógenos, desempenhando um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas (Heidari et al., 2001; Mayadas et al., 2014).

O G-CSF de bovinos (bG-CSF) é uma citocina de ocorrência natural, e sua ligação covalente a polímeros, como o polietilenoglicol (PEG), permite um aumento na duração de sua atividade e do volume hemodinâmico, e redução na depuração renal de primeira passagem e na degradação proteolítica (Kehrli et al., 1991; Molineux, 2003). Alguns estudos com bG-CSF recombinante covalentemente ligado ao PEG comercialmente disponível (PEG bG-CSF; pegbovigrastim) demonstraram aumentar significativamente o número de neutrófilos e a função do mesmo (Mcdougall et al., 2017), além de auxiliar vacas no periparto contra distúrbios imunológicos nesse período, aumentar a produção de leite, devido a uma transição mais saudável e reduzir a susceptibilidade à mastite clínica durante a lactação (Canning et al., 2017; Ruiz et al., 2017).

Contudo, não há informações a respeito da efetividade da resposta do pegbovigrastim frente ao sistema imune e ao perfil metabólico de bezerros, assim como seu efeito sobre o desenvolvimento zootécnico e sua resposta frente a desafio com LPS.

## **2 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da administração do imunostimulante pegbovigrastim sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros, e sua resposta frente a desafio com LPS.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da aplicação do imunostimulante sobre os parâmetros hematológicos de bezerros leiteiros, e a influência desse após desafio com LPS;
  
- Avaliar o efeito da aplicação do imunostimulante sobre os parâmetros bioquímicos de bezerros leiteiros, e a influência desse após desafio com LPS;
  
- Avaliar o efeito da aplicação do imunostimulante sobre os parâmetros zootécnicos de bezerros leiteiros;
  
- Avaliar o efeito da aplicação do imunostimulante na resposta imune induzida por LPS em bezerros leiteiros.

### 3 Revisão Bibliográfica

#### **Bovinocultura Leiteira**

A criação de bovinos é distribuída em todos os continentes, sendo que o Brasil é detentor do segundo maior efetivo desses animais do mundo, sendo responsável por 22,2% do rebanho mundial, ficando atrás apenas da Índia (USDA, 2016). Segundo o IBGE (2016), o efetivo brasileiro atingiu a marca recorde de 218,23 milhões de cabeças, representando um aumento de 1,4% em comparação com o ano anterior.

Do efetivo total de bovinos, 9,0% correspondeu a vacas ordenhadas no ano de 2016, representando 19,67 milhões de animais, dado 6,8% menor em relação ao ano anterior (IBGE, 2016). Entretanto, no mesmo ano, o Brasil apresentou o terceiro maior efetivo de vacas leiteiras, ficando atrás da Índia e da União Europeia (USDA, 2016).

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro (Queiroz et al., 2010). A exploração leiteira é realizada em todo o Brasil, sendo que, somente na produção primária, essa atividade gera mais de três milhões de empregos e soma mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional (Motta et al., 2015).

Apesar de ser a quinta maior potência na produção leiteira mundial em 2016 (USDA, 2016), houve uma redução de 2,9% em relação a 2015, com uma produção de 33,62 bilhões de litros. Sendo que, a região Sul é a maior produtora, sendo responsável por 37,0% do total nacional, ocupando a liderança do ranking desde 2014 (IBGE, 2016).

O leite é considerado um importante produto para o mercado consumidor, devido à necessidade básica do ser humano, e por sua capacidade de produção diversificada. Seus derivados possibilitam a formação de uma variada e importante cadeia produtiva do agronegócio de produtos lácteos (Queiroz et al., 2010).

Em 2016, a produtividade média foi de 1.709 litros/vaca/ano, crescendo 4,2% em relação ao ano anterior. A maior produtividade nacional foi encontrada na região Sul, com 2.966 litros/vaca/ano, representando um aumento de 2,3% quando comparado ao ano de 2015. Sendo que, o melhor indicador foi obtido pelo Rio Grande do Sul, com 3.157 litros/vaca/ano (IBGE, 2016).

Contudo, a atividade leiteira tem evoluído de um modelo tradicional de produção para outro mais competitivo, o que tem exigido da comunidade científica

soluções mais ágeis para se obter aumento da produção, diminuição de custos e em bases sustentáveis (Queiroz et al., 2010).

### **Bezerros**

A saúde no início da vida representa uma condição prévia para uma constituição superior, resultando em uma alta produtividade mais tarde (Ayrle et al., 2016). Uma bezerra saudável é uma bezerra que cresce bem e está livre de doenças, tornando-se uma vaca saudável que produz quantidades rentáveis de leite e é capaz de se reproduzir (Goff, 2006).

Entretanto, um dos principais pontos críticos do sistema de produção leiteira ocorre na cria de bezerros, devido à grande variação da incidência de doenças, ocasionando impactos substanciais em diversos pontos do comércio de produtos lácteos. Além dos custos com tratamento dos animais doentes, as consequências econômicas podem incluir aumento da mortalidade, redução do crescimento e atraso e/ou dificuldade para a primeira parição (Windeyer et al., 2014).

Nos mamíferos, o sistema imune nas primeiras semanas de vida ainda não é totalmente maduro e, aliado ao suprimento de colostro inadequado, o contato com agentes patogênicos pode levar a uma alta morbidade e mortalidade de animais jovens. Além do manejo do colostro, fatores de risco relatados incluem o tamanho da fazenda, habitação, alimentação, doença concomitante, tratamentos perinatais, genética e fatores ambientais (Windeyer et al., 2014). Em bezerros, os primeiros locais de contato desses agentes são os epitélios do trato gastrintestinal e respiratório (Ayrle et al., 2016).

### **Diarreia Neonatal Bovina**

A diarreia neonatal bovina é uma doença comumente relatada, e é uma das principais causas de perdas econômicas e produtivas para os produtores de gado (Cho e Yoon, 2014), estando associadas a alta mortalidade, falhas terapêuticas, perda de peso e desenvolvimento prejudicado (Fortuoso et al., 2017). Segundo Meganck et al. (2015), o risco de prevalência e incidência dessa doença é de 19,1 e 21,2%, respectivamente.

Um dos principais motivos do alto índice de mortalidade causada por essa doença, é a falha de transferência de imunidade passiva pelo manejo inadequado de colostro (USDA, 2007). Ela é caracterizada por um aumento no número de

defecações, fezes aquosas, rápida desidratação e uma acidose progressiva, que pode levar o animal à óbito caso não seja tratada em tempo hábil (Radostits et al., 2002).

Essa enfermidade possui uma etiologia multifatorial, em que patógenos entéricos, como bactérias, vírus e protozoários, estão envolvidos no seu desenvolvimento, assim como fatores não infecciosos, como imunidade, habitação, alimentação e condições de higiene (Bartels et al., 2010; Cho e Yoon, 2014). Dentre os diversos agentes infecciosos identificados como causadores de diarreia em bovinos, a *Escherichia coli*, coronavírus, *Cryptosporidium parvum* e o rotavírus, foram detectados em mais de 75% dos casos de infecções intestinais em bezerros jovens (Bartels et al., 2010; Cho e Yoon, 2014). Sendo que, estudos demonstram que a prevalência maior encontrada é de rotavírus e *Cryptosporidium parvum* (Graaf et al., 1999; Uhde et al., 2008; Meganck et al., 2015).

## **Broncopneumonia**

A broncopneumonia é uma doença multifatorial, que em bezerros requer a combinação ativa de um ou mais agentes infecciosos e do meio ambiente com o hospedeiro para que possa se desenvolver (Bowland e Shewen, 2000; Gonçalves et al., 2011). As causas microbianas prevalentes incluem causas virais (rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina, respiratório sincicial bovino), bacteriana (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*) e micoplasma (Snowder et al., 2006).

Os agentes patogênicos atingem os pulmões principalmente pelos brônquios e pela corrente sanguínea (Radostits et al., 2002), sendo que os animais mais susceptíveis são aqueles que sofreram falha na transferência de imunidade passiva, ou foram expostos a estresse contínuo, como mudanças nutricionais ou clima (Snowder et al., 2006; Gonçalves et al., 2011).

No processo inflamatório da broncopneumonia, as células de defesa liberam enzimas e substâncias tóxicas que lesam os tecidos adjacentes. Dessa maneira, essa doença pulmonar interfere de forma negativa no desenvolvimento dos bezerros, reduzindo o rendimento e comprometendo a produção futura, além dos custos com o tratamento para o produtor (Gonçalves et al., 2011).

## **Sistema Imunológico de Bezerros Neonatos**

O sistema imunológico é responsável pela defesa contra microrganismos infecciosos, sendo essencial para a vida (Tizard 2009; Murphy, 2014). Essa defesa é mediada pelas barreiras físicas, que evitam a penetração de microrganismos invasores; a imunidade inata, que fornece uma rápida proteção inicial; e a imunidade adquirida, responsável por uma imunidade efetiva mais duradoura (Tizard, 2009). Embora esse sistema seja capaz de responder e inferir diferentes níveis de proteção, essa combinação de imunidade passiva e ativa que proporciona proteção ao recém-nascido (Cortese, 2009).

Ao nascimento, o sistema imune dos bovinos está totalmente desenvolvido, porém imaturo (Cortese, 2009; Tizard, 2009). Apesar de haver um grande número de células fagocitárias no recém-nascido, a função dessas células é diminuída, devido a maturação do sistema imune em mamíferos ser lenta, sendo observada por volta dos 5 aos 8 meses de idade nos bovinos, fazendo com que eles sejam mais susceptíveis aos agentes patogênicos no início da vida (Cortese, 2009; Gomes et al., 2017). Além disso, a placenta de bovinos é do tipo sindesmocorial, caracterizada por apresentar um sincício entre o endométrio maternal e o trofoblasto fetal, o que impede a comunicação do sangue da mãe com o do feto e, por isso, não há transferência transplacentária de anticorpos e leucócitos, sendo essa passagem realizada exclusivamente através do colostro (Peter, 2013).

### **Imunidade Passiva**

O sistema imune dos bezerros recém-nascidos é incapaz de produzir Ig suficientes para combater desafios do ambiente (Coelho, 2009). Além disso, as Igs maternas não atravessam via placenta, dessa forma o animal é desprovido de anticorpos protetores. Devido a essa peculiaridade, o colostro se torna de suma importância, visto que é a primeira secreção da glândula mamária após o parto (Goff, 2006).

O consumo do colostro nas primeiras horas de vida determina o estado da imunidade passiva e influencia o estado nutricional, metabólico e endócrino dos mesmos (Blum, 2006; Kindlein et al., 2017). A sua absorção é realizada por células intestinais, e começa a diminuir de 6 a 12 horas após o nascimento, e termina em média após 48 horas (Chase et al., 2008). Estudos demonstraram que o consumo adequado de colostro é capaz de reduzir as doenças entéricas e respiratórias, e

consequentemente a morbidade e mortalidade de bezerros neonatos (Donovan et al., 1998; Berge et al., 2009; Kindlein et al., 2017).

O colostro representa uma importante fonte de Igs, além de conter citocinas e leucócitos maternos, que juntos contribuem para a imunoproteção do neonato (Gomes et al., 2017; Gonzalez e Santos, 2017). Além desses fatores imunes, a secreção mamária é uma fonte de lactobacilos e bifidobactérias, que são importantes para o desenvolvimento da imunidade de mucosas e da saúde intestinal (Gomes et al., 2017).

A concentração de Igs no colostro bovino é de aproximadamente 90% de IgG, 5% de IgA e 7% de IgM. O IgG, principal componente, tem como função principal a neutralização e a opsonização dos microrganismos, além de participar na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Gomes et al., 2017). Com relação as células brancas, elas têm a capacidade de melhorar os mecanismos de defesa do animal recém-nascido por meio da transferência de imunidade mediada por células, transferência passiva avançada de Igs, atividade bactericida local e fagocitária no trato digestivo e aumento da atividade linfocitária (Cortese, 2009; Kindlein et al., 2017).

## **Imunidade Inata e Adquirida**

Os microrganismos podem causar diversas enfermidades, por isso o organismo animal utiliza múltiplos e simultâneos sistemas de defesa. Dessa maneira, se um patógeno conseguir ultrapassar a primeira barreira defensiva, em seguida encontra uma segunda barreira, e assim consecutivamente (Tizard, 2009). O sistema imune dos vertebrados trabalha em três níveis de defesa (Delves et al., 2013).

A primeira barreira encontrada no organismo é a física, formada pela pele e pelas secreções mucosas do trato respiratório, digestivo e reprodutivo (Delves et al., 2013). Porém, apesar de essencial, essa barreira não consegue ser completamente eficiente sozinha. Dessa forma, a defesa pode ser mediada pelas reações iniciais da imunidade inata, ou pelas tardias da imunidade adquirida (Tizard, 2009).

A resposta imune inata inicia-se quase imediatamente após a entrada de um organismo estranho no corpo. As células e moléculas que fazem parte desse sistema são responsáveis por detectar determinados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que em condições normais não são encontrados no corpo. Quando detectado um PAMP, o sistema imune inato tenta destruir esses agentes infecciosos, através de enzimas destrutivas ou proteínas de ataque a membrana (Delves et al., 2013). Esse sistema de defesa é relativamente inespecífico, porém

muito efetivo, e ele não apresenta memória, ou seja, cada infecção é tratada da mesma maneira e intensidade (Tizard, 2009).

A resposta imune adaptativa demora mais tempo para aparecer, porém são adaptadas especificamente ao tipo de agente infeccioso envolvido, aumentando a cada novo contato com esse agente (memória imunológica). Essa resposta é mediada principalmente por linfócitos T e B que vão reconhecer as moléculas de antígenos, estimulando a proliferação e a diferenciação dessas células (Tizard, 2009; Delves et al., 2013).

## **Neutrófilos**

Tanto as respostas imunes inatas quanto adaptativas, dependem de atividades das células sanguíneas brancas (leucócitos), derivadas de células-tronco originárias da medula óssea (Murphy, 2014). Sendo que, dois tipos dessas células, os neutrófilos e macrófagos, são especializados nos processos de fagocitose e morte dos agentes infecciosos (Tizard, 2009).

Os neutrófilos são as principais células imunes de combate aos patógenos (Mayadas et al., 2014), sendo conhecidos também como granulócitos polimorfonucleares (PMNs), por apresentarem o citoplasma repleto de grânulos, e núcleos irregulares e lobulados. Essas células morrem após alguns dias, por isso são repostas continuamente (Tizard, 2009), sendo necessário aproximadamente duas semanas para que os metamielócitos (neutrófilos em estágio intermediário) se diferenciem de imaturos para uma forma de bastonete, e então para a forma madura segmentada (Doan et al., 2008).

Os neutrófilos são componentes essenciais do sistema imunológico, desempenhando um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas (Heidari et al., 2001), onde o seu aumento no sangue é frequentemente um indicador de infecção aguda (Doan et al., 2008). A principal função dessas células é a capacidade de serem recrutadas para locais de infecção, para reconhecer e fagocitar microrganismos, e depois combater esses patógenos por meio de mecanismos citotóxicos combinados, como por meio da produção de espécies reativas de oxigênio ou pela liberação de peptídeos antimicrobianos (Mayadas et al., 2014).

## Lipopolissacarídeo

O LPS, também conhecido como endotoxina, é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, sendo conhecido como importante ativador da resposta imunológica. Essa molécula altamente tóxica é liberada quando a bactéria se multiplica ou é fagocitada e degradada por células de defesa (Cruz-Machado, 2010).

A estrutura do LPS é composta por duas camadas de açúcar, parte hidrofílica, e uma camada lipídica, parte hidrofóbica. Essa porção lipídica é responsável pela maior ação antigênica do LPS (Raetz e Whitfield, 2002; Cruz-Machado, 2010). Essa endotoxina desencadeia vias de sinalização intracelular por meio da sua ligação à receptores próprios (Cruz-Machado, 2010).

Os receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs) pertencem à família de receptores de reconhecimento de padrões que reconhecem diversos PAMPs. Os TLRs são proteínas transmembranas que estão localizados em várias membranas celulares (Chen et al., 2016). A isoforma 4 desse receptor (TLR4) é capaz de reconhecer principalmente estímulos de LPSs (Chen et al., 2016), sendo esse reconhecimento medido ainda por outras moléculas como a proteína ligante de LPS (LBP), o grupamento de diferenciação (CD14) que pode estar sobre a forma solúvel na circulação ou ancorada à membrana celular, e a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD2), que também pode ser encontrada nas duas formas. Na forma solúvel, as proteínas LBP, CD14 e MD2 atuam como auxiliares, sendo responsáveis por transferir LPSs para o receptor TLR4 (Cruz-Machado, 2010).

O LPS é uma substância capaz de estimular intensamente a resposta imune inata da maioria dos animais, sendo utilizado para simular a resposta imunológica a uma infecção bacteriana (Alexander e Rietschel, 2001). O desafio com LPS é utilizado como modelo para estudo de resposta de fase aguda, já que os eventos ocorrem de maneira semelhante à uma infecção por bactérias gram-negativas (Cecilianí et al., 2012).

### Fatores Estimuladores de Colônias

A resistência a doenças é mediada por diversos fatores físicos e químicos, assim como por componentes humorais e celulares do sistema imunológico. O papel dos fagócitos do sangue periférico na prevenção de novas infecções no organismo, é um dos mais importantes mecanismos de defesa não específicos do hospedeiro.

Desse modo, o conhecimento acerca de como as células intervêm na resistência às doenças, e quais condições podem reduzir a capacidade dessas células de combater a infecção, levaram ao estudo dos efeitos imunomoduladores de várias citocinas em bovinos (Kehrli et al., 1991).

Os CSFs são uma família de citocinas de glicoproteínas que desempenham um papel fundamental na regulação da hematopoiese e da inflamação. Esse termo surgiu a partir da observação da atuação do CSF sobre células progenitoras para estimular a formação de colônias que compreendem células maduras (Kehrli et al., 1991; Ruiz et al., 2017). A capacidade de aumentar a rapidez de uma resposta inflamatória, assim como a capacidade funcional de resposta das células, podem ter um efeito sobre a eficácia de prevenir infecções oportunistas em bovinos nos quais os mecanismos de defesa tenham sido comprometidos (Kehrli et al., 1991).

### **Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos**

A produção e diferenciação de neutrófilos é regulada pelo G-CSF, um fator de crescimento hematopoiético endógeno responsável pelo aumento drástico no número de neutrófilos em resposta a infecção ou danos que afetam a função da medula óssea (Bendall e Bradstock, 2014; Canning et al., 2017). O G-CSF pode ser produzido por muitos tecidos quando, de maneira apropriada, são estimulados por mediadores inflamatórios, como: LPS, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), *interferon* beta (IFN- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucinas (IL-17 e IL-1), induzindo expressão em células endoteliais, macrófagos, células epiteliais e fibroblastos (Bendall e Bradstock, 2014).

O G-CSF induz a diferenciação de células progenitoras de neutrófilos maduros, reduz o tempo de maturação na medula óssea, e altera a funcionalidade ao aumentar a fagocitose e a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos e pela iniciação da oxidação (Mcdougall et al., 2017). Sua concentração plasmática é geralmente baixa, mas aumenta rapidamente em resposta à infecção, voltando a diminuir com a recuperação (Bendall e Bradstock, 2014).

### **Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos Bovinos**

O bG-CSF é uma citocina bovina de ocorrência natural, produzida por leucócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos. É uma proteína globular monomérica, essencialmente  $\alpha$ -hélice, com peso molecular de 19 kD (Roberts et al.,

2003). Porém, o DNA complementar (DNAC) de bG-CSF foi clonado, sequenciado e expresso como uma proteína biologicamente ativa, utilizando um plasmídeo de expressão recombinante de *Escherichia coli*, demonstrando induzir uma neutrofilia pronunciada e aumentar a atividade fagocítica e citotóxica por neutrófilos (Kehrli et al., 1991; Canning et al., 2017).

A ligação covalente a polímeros, como o PEG, permite a modificação de proteínas nativas, prolongando a duração da sua atividade, aumentando o volume hemodinâmico, reduzindo a depuração renal de primeira passagem e reduzindo a degradação proteolítica (Kehrli et al., 1991; Molineux, 2003).

Em estudo realizado por Kimura et al. (2014), com o intuito de melhorar a função PMN de neutrófilos, foi aplicado o PEG rbG-CSF em vacas, duas vezes por via subcutânea (SC), cerca de 6 dias antes do parto e 24 horas após o parto, demonstrando aumentar rápida e drasticamente o número de neutrófilos após aplicação do PEG rbG-CSF e mantendo-se elevada por pelo menos mais 13 dias após o parto. Em outro estudo realizado por Hassfurther et al. (2015), foi avaliado diferentes doses de PEG bG-CSF na incidência de mastite clínica no gado leiteiro durante o periparto, sendo administrado 7 dias antes do parto e 24 após o parto, por via SC, demonstrando reduzir significativamente os casos de mastite clínica, não afetando a produção ou a composição do leite.

## **Pegbovigrastim**

A solução injetável para bovinos (Imrestor™, Elanco Saúde Animal, Brasil) contém a substância ativa pegbovigrastim (PEG bG-CSF), utilizada como adjuvante na redução de mastite clínica em vacas leiteiras durante o periparto e em novilhas nos 30 dias seguintes ao parto. O pegbovigrastim é uma forma modificada da citocina imunorreguladora de ocorrência natural, o bG-CSF (EMA, 2015).

Esse medicamento aumenta o número de neutrófilos circulantes, e já foi demonstrado que melhora as capacidades microbicidas mediadas por haleto de peróxido de hidrogênio mieloperoxidase dos neutrófilos. Não existem informações disponíveis a respeito da farmacocinética do produto (EMA, 2015).

**4 Artigo**

O artigo será submetido, após as devidas correções, para a revista *Journal of Dairy Science*.

1 **Parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros submetidos a**  
2 **administração do imunoestimulante pegbovigrastim**

3

4 **F. Kegles,\* O. C. Madruga,\* E. Schmoeller,\* L. F. Bragança,\* U. S. Londero,\* J. O. Feijó,\***  
5 **E. Schmitt,\* M. N. Corrêa\*, F. A. B. Del Pino\*<sup>1</sup>**

6 \*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária, Universidade Federal de Pelotas, CEP  
7 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

8 <sup>1</sup>Francisco Augusto Burkert Del Pino, Departamento de Clínicas Veterinárias, Campus  
9 Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brasil, +55 53 32757136,  
10 nupeec@gmail.com

11

12

### RESUMO

13 O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia da administração do imunoestimulante  
14 pegbovigrastim sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros  
15 leiteiros, e sua resposta frente a desafio com lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, foram  
16 realizados dois experimentos, no primeiro utilizou-se 20 bezerras recém-nascidas da raça  
17 Holandês, divididas em dois grupos: grupo Imrestor (IMR, n = 10), que recebeu uma  
18 administração subcutânea (SC) de 25 µg/kg de peso vivo de pegbovigrastim, e grupo Controle  
19 (CTR, n = 10) que recebeu uma administração de placebo (solução fisiológica 0,9%), ambas no  
20 décimo dia de vida dos animais. Coletas de sangue foram realizadas nos dias 10, 12 e 14, em  
21 relação ao nascimento, para analisar os parâmetros bioquímicos e hematológicos, e também  
22 foram realizadas avaliações zootécnicas nos dias 0, 7, 14, 21 e 60 em relação ao nascimento.  
23 Observa-se que há um aumento no número de leucócitos totais no grupo IMR nos dias 12 e 14  
24 em comparação ao grupo CTR, assim como a contagem de neutrófilos segmentados, neutrófilos  
25 bastonetes e monócitos. Não foi observado diferenças nos demais parâmetros hematológicos,

26 bioquímicos e zootécnicos analisados. Já no segundo experimento, foram utilizados 20 bezerros  
27 da raça Holandês até sessenta dias de vida, separados em quatro grupos: grupo 1 (LPS, n = 5)  
28 que recebeu uma aplicação única endovenosa (EV) de LPS de *Escherichia coli* no dia 0, na  
29 dose de 0,25 µg/kg de peso vivo; grupo 2 (IMR, n = 5), que recebeu uma aplicação SC de  
30 pegbovigastim no dia 1 em relação a aplicação do LPS, na dose de 25 µg/kg de peso vivo;  
31 grupo 3 (IMR+LPS, n = 5), que recebeu uma aplicação de LPS na dose de 0,25 µg/kg no dia 0,  
32 e 25 µg/kg de peso vivo de pegbovigastim no dia 1; e grupo 4 (CTR, n = 5), que recebeu uma  
33 dose placebo de cloreto de sódio 0,9% por via EV no dia 0 e outra dose SC no dia 1. Para análise  
34 dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, foram realizadas coletas de sangue nos dias -1,  
35 0, 1, 2, 3, 4, 8, 14 e 21 em relação a aplicação de LPS. Observa-se um aumento no número de  
36 leucócitos totais nos grupos IMR, IMR+LPS e LPS, sendo que o grupo IMR manteve-se com  
37 o maior número de células desde o dia 2 até o dia 21. Os níveis de paraoxonase 1 foram maiores  
38 no grupo IMR em comparação a todos os outros. A administração de IMR não alterou  
39 metabólitos fundamentais para o funcionamento hepático, renal e proteico dos bezerros. Os  
40 estudos demonstraram que a administração de pegbovigastim aumenta o número de neutrófilos  
41 circulantes, sem afetar parâmetros bioquímicos e zootécnicos dos animais.

42

43 **Palavras-chave:** bezerro leiteiro, imunoestimulante, lipopolissacarídeo, pegbovigastim.

44

45

## INTRODUÇÃO

46

47

48

49

50

A fase de cria de bezerros é um dos pontos críticos da produção de leite, devido à grande  
variação da incidência de doenças, que além dos custos com tratamento dos animais doentes,  
pode incluir redução do crescimento e atraso e/ou dificuldade para a primeira parição  
(Windeyer et al., 2014). Durante essa fase, o sistema imune dos bezerros ainda é imaturo e,  
além disso, a placenta de bovinos é do tipo sindesmocorial, caracterizada por apresentar um

51 sincício entre o endométrio materno e o trofoblasto fetal, o que impede a comunicação do  
52 sangue da mãe com o do feto (Peter, 2013). Dessa forma, a primeira linha de defesa do bezerro  
53 é obtida através do colostro que confere proteção imunológica durante as primeiras duas a  
54 quatro semanas de vida. Em contrapartida, os componentes imunes essenciais, apesar de  
55 estarem presentes, não são funcionais até duas a quatro semanas de idade (Chase et al., 2009).  
56 Nesse intervalo de tempo, conhecido como janela imunológica, entre a segunda e quarta  
57 semanas, não se conhece a eficiência da imunidade do bezerro.

58 Por isso, o manejo inadequado do colostro, ou ainda, fatores de risco como habitação,  
59 alimentação, doença concomitante, tratamentos perinatais, genética e fatores ambientais,  
60 aumentam o risco do contato com agentes patogênicos, resultando em alta morbidade e  
61 mortalidade desses animais (Windeyer et al., 2014). Em bezerros, os primeiros locais de contato  
62 desses agentes são os epitélios do trato gastrointestinal e respiratório, sendo que as enfermidades  
63 mais incidentes são a diarreia neonatal bovina e a broncopneumonia, respectivamente (Ayrle et  
64 al., 2016).

65 A resistência a doenças é mediada por diversos fatores físicos e químicos, assim como  
66 por componentes humorais e celulares do sistema imunológico. O papel dos fagócitos do sangue  
67 periférico na prevenção de novas infecções no organismo é um dos mais importantes  
68 mecanismos de defesa não específicos do hospedeiro. Dessa maneira, o conhecimento acerca  
69 de como as células intervêm na resistência às doenças, e quais condições podem reduzir a  
70 capacidade dessas células de combater a infecção, levaram ao estudo dos efeitos  
71 imunomoduladores de várias citocinas nos bovinos (Kehrli et al., 1991).

72 Os fatores estimuladores de colônias (**CSFs**) são um grupo de citocinas hematopoiéticas  
73 fundamentais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células progenitoras da  
74 medula óssea (Heidari et al., 2001; Canning et al., 2017). Os neutrófilos são as principais células  
75 imunes de combate aos patógenos, e sua produção é regulada pelo fator estimulador de colônias

76 de granulócitos (**G-CSF**) que induz a diferenciação de células progenitoras de neutrófilos  
77 maduros, reduz o tempo de maturação na medula óssea, e altera a funcionalidade ao aumentar  
78 a fagocitose e a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos e pela iniciação  
79 da oxidação (Mayadas et al., 2014; McDougall et al., 2017).

80 Nos bovinos, G-CSF de bovinos (**bG-CSF**) é uma citocina de ocorrência natural,  
81 produzida por leucócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos (Kehrli et al., 1991;  
82 Canning et al., 2017). Para ser expressa como uma proteína biologicamente ativa, o DNA  
83 complementar (**DNAc**) de bG-CSF foi clonado e sequenciado, utilizando um plasmídeo de  
84 expressão recombinante de *Escherichia coli*, demonstrando induzir uma neutrofilia  
85 pronunciada e aumentar a atividade fagocítica e citotóxica por neutrófilos (Kehrli et al., 1991;  
86 Canning et al., 2017). Além disso, a ligação covalente dessa citocina a polímeros, como o  
87 polietilenoglicol (**PEG**), permite um aumento na duração de sua atividade, em torno de 7 a 14  
88 dias, e do volume hemodinâmico, além da redução na depuração renal de primeira passagem e  
89 na degradação proteolítica (Kehrli et al., 1991; Molineux, 2003).

90 A utilização do bG-CSF recombinante covalentemente ligado ao PEG (**PEG bG-CSF**)  
91 já demonstrou aumentar significativamente a concentração e a função de neutrófilos em animais  
92 adultos, (McDougall et al., 2017), auxiliar vacas no periparto contra distúrbios imunológicos,  
93 aumentar a produção de leite e reduzir a susceptibilidade à mastite clínica durante a lactação  
94 (Canning et al., 2017; Ruiz et al., 2017). Entretanto, não há informações a respeito da  
95 efetividade da resposta do PEG bG-CSF frente ao sistema imune e ao perfil metabólico de  
96 bezerros, assim como seu efeito sobre o desenvolvimento zootécnico e a capacidade de diminuir  
97 a intensidade das respostas imunes induzidas por lipopolissacarídeos (**LPSs**), que são  
98 endotoxinas capazes de desencadear uma resposta inflamatória no organismo pelo aumento na  
99 produção de citocinas pró-inflamatórias (Crisan et al., 2015). Diante do exposto, o objetivo do  
100 estudo foi avaliar os efeitos da administração de imunoestimulante PEG bG-CSF

101 (pegbovigra<sup>st</sup>im) sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerras  
102 leiteiros, e sua resposta frente a desafio com LPS.

103

104

## MATERIAIS E MÉTODOS

105 O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da  
106 Universidade Federal de Pelotas, sob o número 9382, sendo realizados dois estudos, os quais  
107 foram conduzidos em duas propriedades comerciais diferentes no sul do Rio Grande do Sul:  
108 31°44'S, 52°28'O (experimento I) e 32°16'S, 52°33'O (experimento II). Em ambos os  
109 experimentos, foi administrado o imunostimulante PEG bG-CSF (pegbovigra<sup>st</sup>im, Imrestor<sup>TM</sup>,  
110 Elanco Saúde Animal, Brasil), na dosagem de 25µg/kg de peso vivo, por via subcutânea (SC).

111

112 *Animais e grupos experimentais:* No primeiro experimento, foram utilizadas 20 bezerras  
113 recém-nascidas da raça Holandês, sendo consideradas aptas para entrarem no experimento  
114 apenas aquelas que apresentaram valores de proteínas plasmáticas totais (**PPTs**) acima de 5,5  
115 g/dL de 12 a 24 horas após a ingestão do colostro, e sem alterações clínicas até o décimo dia de  
116 vida. Os animais recebiam leite duas vezes ao dia (8h00min e 16h00min), totalizando 4 litros  
117 por dia, com água e concentrado *ad libitum*, sendo fornecido em até 3% do peso vivo, ajustado  
118 semanalmente de acordo com o NRC (2001).

119 As bezerras desse experimento foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo  
120 Imrestor (**IMR**, n = 10) com peso médio (kg) ao nascimento de  $41,70 \pm 1,94$ , que recebeu a  
121 administração SC de 25 µg/kg de peso vivo de pegbovigra<sup>st</sup>im; e Grupo Controle (**CTR**, n =  
122 10) com peso médio (kg) ao nascimento de  $42,05 \pm 1,94$ , que recebeu a administração de  
123 placebo de cloreto de sódio (**NaCl**) a 0,9%, ambas as administrações foram realizadas no  
124 décimo dia de vida dos animais.

125 Para o experimento II, foram utilizados 20 bezerros da raça Holandês até sessenta dias  
126 de vida, mantidos em sistema intensivo de produção sob as mesmas condições de manejo e  
127 alocadas em baias individuais. Os animais foram separados em quatro grupos: grupo 1 (LPS, n  
128 = 5), que recebeu uma aplicação única endovenosa (**EV**) de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-  
129 Aldrich® Inc., Missouri, Estados Unidos) no D0, na dose de 0,25 µg/kg de peso vivo; grupo 2  
130 (IMR, n = 5), que recebeu uma aplicação SC do pegbovigrastim no D1, na dose de 25 µg/kg de  
131 peso vivo; grupo 3 (IMR+LPS, n = 5), que recebeu uma aplicação de LPS na dose de 0,25 µg/kg  
132 no D0, e 25 µg/kg de peso vivo de pegbovigrastim no D1; grupo 4 (CTR, n = 5), que recebeu  
133 uma dose placebo de NaCl 0,9% por via EV no D0 e outra dose SC no D1, conforme o cálculo  
134 para seus pesos.

135135

136 **Análises sanguíneas:** Foram realizadas coletas de sangue por punção da veia jugular utilizando  
137 o sistema *Vacutainer* (Vacuplast®, Shandong, China). Sendo que, as amostras foram coletadas  
138 em dois frascos: um com ácido etilenodiaminotetracíclico (**EDTA**), para realizar análises de  
139 hemograma completo; e outro com sílica (ativador de coágulo), para obtenção do soro e  
140 realização das análises bioquímicas.

141 No experimento I, as coletas foram realizadas nos dias 0, 10, 12 e 14, em relação ao  
142 nascimento, sendo as amostras do dia 0 (**D0**) utilizadas apenas para a adição ou exclusão dos  
143 animais. Enquanto que, no experimento II, foram feitas nos dias -1, 0, 1, 2, 3, 4, 8, 14 e 21 em  
144 relação a aplicação de LPS.

145 Logo após a coleta, as amostras com sílica de ambos os experimentos foram  
146 centrifugadas (Centrífuga Sirius 4000, Sieger, Paraná, Brasil) a 1800 x g durante 15 minutos, a  
147 fim de se obter o soro. Em seguida, foram repassadas para tubos *eppendorf* e armazenados a -  
148 20°C para posteriores análises de albumina (**ALB**), aspartato aminotransferase (**AST**),  
149 creatinina (**CREAT**), gama glutamil transferase (**GGT**), PPT e ureia (**URE**), utilizando kits

150 comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brasil). Além disso, no experimento II foi  
151 realizada também a análise de proteína C reativa (**PCR**). A leitura das amostras foi realizada  
152 no analisador bioquímico automático Labmax Plenno (Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais,  
153 Brasil). A concentração de globulina (**GLO**) foi determinada pelo resultado da subtração de  
154 ALB das PPT (Silva et al., 2008).

155 As amostras dos dias 10, 12 e 14 do primeiro experimento, e dos dias 0, 2 e 8 do segundo  
156 experimento, foram utilizadas para aferir a concentração de haptoglobina (**HP**) utilizando o  
157 método colorimétrico descrito por Jones e Mould (1984) e adaptado por Schneider et al. (2013),  
158 utilizando o leitor de microplaca (Thermo Plate<sup>®</sup> TP-Reader, São Paulo, Brasil). Ademais, essas  
159 amostras foram utilizadas também para analisar a atividade sérica da paraoxonase 1 (**PON1**) a  
160 partir de protocolo descrito por Browne et al. (2007). A leitura foi realizada em  
161 espectrofotômetro UV-VIS (Femto, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 270 nm e  
162 um tempo de leitura de 30 segundos, sendo a atividade da enzima determinada pela fórmula:  $\Delta$   
163 absorvância x 115 x 4.

164 As amostras do D0 do experimento I foram submetidas a centrifugação em micro-  
165 hematócrito digital (Benfer, São Paulo, Brasil) com tubos capilares de 1,0 mm de espessura  
166 interna (Perfecta, São Paulo, Brasil) submetidos a 5 minutos de centrifugação à 5000 rpm. Em  
167 seguida, o tubo capilar foi diretamente lido no refratômetro (Atago<sup>®</sup>, Tóquio, Japão) para  
168 análise de PPT. As demais amostras com EDTA desse experimento foram enviadas à um  
169 laboratório comercial, para realização do hemograma com avaliação do eritrograma e  
170 leucograma.

171 Para realização do hemograma do experimento II, a contagem do número de eritrócitos  
172 e leucócitos totais foi realizada no contador automático de células CC-530 (CELM, São Paulo,  
173 Brasil) pelo método de impedância. Sendo que, inicialmente, as amostras foram diluídas no  
174 diluidor automático DA-500 (CELM, São Paulo, Brasil) em 1:500 para contagem de leucócitos

175 totais, e 1:49999 para os eritrócitos. O diferencial celular leucocitário foi determinado pela  
176 contagem de 100 células em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido (LaborClin®,  
177 Paraná, Brasil) e lidos no microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc.,  
178 Tóquio, Japão), por um único avaliador.

179 O hematócrito de cada amostra desse segundo experimento foi determinado, em  
180 duplicata, utilizando-se centrífuga de micro-hematócrito digital (Benfer, São Paulo, Brasil) com  
181 tubos capilares de 1,0 mm de espessura interna (Perfecta, São Paulo, Brasil) submetidos a 5  
182 minutos de centrifugação à 5000 rpm, e mensurados com auxílio de uma régua de leitura para  
183 micro-hematócrito. Após essa análise, um dos tubos capilares foi utilizado para determinação  
184 de PPT por refratômetro (Atago®, Tóquio, Japão), enquanto que o outro foi colocado em banho-  
185 maria (Quimis, São Paulo, Brasil) por 5 minutos a 56°C e, em seguida, centrifugado novamente,  
186 nas mesmas condições, e lido no refratômetro para análise de fibrinogênio.

187187

188 **Avaliações do desempenho:** As avaliações de desempenho zootécnico foram realizadas apenas  
189 no primeiro experimento, nos dias 0, 7, 14, 21 e 60, em relação ao nascimento. Para a medida  
190 de peso foi utilizada fita de medida específica para raças leiteiras de grande porte (Bovitec®,  
191 São Paulo, Brasil), enquanto que as medidas de perímetro torácico, altura de cernelha e largura  
192 da garupa foram aferidas através de fita métrica. Além disso, foi avaliado a ocorrência ou não  
193 de diarreia até 21 dias após o nascimento, de acordo com o manejo da fazenda.

194194

195 **Análises estatísticas:** Os dados obtidos em ambos os experimentos foram analisados no  
196 programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA, 2016). As variáveis foram  
197 submetidas ao teste de SHAPIRO WILK ( $P > 0,90$ ), sendo que aquelas consideradas normais  
198 tiveram suas médias analisadas através do método MIXED MODELS, considerando o grupo,  
199 o momento da coleta e suas interações (Littell et al., 1998). A comparação de médias individuais

200 foi realizada através do teste de Tukey-Kramer. Para avaliação do número de casos de diarreia  
201 entre os grupos, foi utilizado o teste teste t de Student. Foram considerados significativos  
202 valores de  $P < 0,05$ .

203

204

## RESULTADOS

205 No primeiro experimento, observamos um aumento no número de leucócitos totais ( $P <$   
206  $0,0001$ ; Figura 1A) no grupo IMR 48 horas (D12) após aplicação do pegbovigastim, e se  
207 manteve alto 96 horas (D14) após o tratamento em comparação ao grupo CTR. Junto a este, foi  
208 observado um aumento na contagem de neutrófilos segmentados ( $P < 0,0001$ ; Figura 1B),  
209 neutrófilos bastonetes ( $P < 0,0001$ ; Figura 1C) e monócitos ( $P = 0,0002$ ; Figura 1D) nos  
210 mesmos dias para o grupo IMR. Não foi observado diferenças nos demais parâmetros  
211 hematológicos e bioquímicos analisados ( $P > 0,05$ ; Tabela 1 e 2, respectivamente) nesse  
212 experimento.

213 No segundo experimento observamos um aumento no número de leucócitos totais ( $P <$   
214  $0,0001$ ; Figura 4A) nos grupos IMR, IMR+LPS e LPS, sendo que o grupo IMR manteve-se  
215 com o maior número de células desde as 24 horas após aplicação do pegbovigastim (D2) até  
216 as 480 horas após (D21). O grupo CTR apresentou níveis mais baixos de leucócitos totais ( $P >$   
217  $0,05$ ; Figura 4A), porém estáveis e em quantidades basais. O grupo LPS apresentou um maior  
218 número de leucócitos totais ( $P < 0,05$ ; Figura 4A) 24 horas após a aplicação do LPS (D1),  
219 estando superior aos demais grupos nesse período. Esse padrão foi observado nas mesmas  
220 proporções pelos neutrófilos segmentados ( $P < 0,0001$ ; Figura 4B) e em menor grau pelos  
221 linfócitos ( $P < 0,0001$ ; Figura 4D). Nos neutrófilos bastonetes ( $P < 0,0001$ ; Figura 4C), houve  
222 um aumento significativo dos grupos IMR e IMR+LPS 24 horas após a aplicação do  
223 pegbovigastim (D2). Não foi observado diferenças entre os grupos nos demais parâmetros  
224 hematológicos ( $P > 0,05$ ; Tabela 4).

225 Para os parâmetros bioquímicos do experimento II, observamos que o grupo IMR  
226 manteve os níveis de ALB iguais ao CTR, em contrapartida o grupo IMR+LPS foi menor que  
227 o grupo IMR ( $P = 0,0007$ ) mas igual ao grupo CTR, e o grupo LPS foi o que apresentou menores  
228 níveis. Contudo, os níveis de PON1 foram maiores no grupo IMR ( $P = 0,02$ ) em comparação  
229 aos demais grupos. Quanto aos níveis de PCR, pode-se determinar que o grupo CTR diferiu do  
230 grupo LPS obtendo concentrações mais baixas ( $P = 0,03$ ). Para AST, o grupo IMR não diferiu  
231 do grupo CTR, e os grupos IMR+LPS e LPS diferiram entre si e com IMR e CTR ( $P < 0,0001$ ),  
232 sendo que o grupo IMR+LPS apresentou os níveis mais baixos deste metabólito. Com relação  
233 ao GGT, observamos que o grupo IMR+LPS apresentou os valores mais elevados ( $P = 0,0042$ ),  
234 diferindo dos demais grupos. Os níveis de URE foram maiores nos grupos IMR, CTR e LPS  
235 não diferindo entre si, contudo o grupo IMR+LPS obteve os valores mais inferiores diferindo  
236 dos grupos IMR e CTR ( $P = 0,02$ ). Além disso, quanto a CREAT, os grupos IMR e LPS  
237 apresentaram os níveis menores, o grupo IMR+LPS demonstrou menores índices ( $P = 0,02$ ), e  
238 o grupo LPS não diferiu de nenhum grupo. Os demais metabólitos estudados (GLO, HP e PPT;  
239  $P > 0,05$ ; Tabela 5), não apresentaram diferenças entre os grupos.

240 Quando analisamos os parâmetros zootécnicos do experimento I, observamos que não  
241 houve diferenças entre os grupos ( $P > 0,05$ ; Tabela 3) ou quanto ao ganho de peso médio diário  
242 (**GMD**;  $P > 0,05$ ; Figura 2), apenas entre os dias avaliados ( $P < 0,0001$ ; Tabela 3, Figura 2).  
243 Além disso, também não observamos diferenças entre os grupos com relação ao número de  
244 casos de diarreia ( $P > 0,05$ ; Figura 3).

245

246

## DISCUSSÃO

247 Este estudo avaliou os efeitos da administração de pegbovigastim sobre parâmetros  
248 hematológicos, bioquímicos e zootécnicos de bezerros leiteiros. Nós hipotetizamos que, por  
249 estimular o aumento do número de neutrófilos em estados de saúde ou doença (Bendall e

250 Bradstock, 2014), a bG-CSF pode contribuir na melhora da imunidade desses animais, sem  
251 causar danos ao metabolismo energético ou hepático.

252 Os neutrófilos são as principais células imunes de combate aos patógenos, sendo  
253 recrutadas para locais de infecção para reconhecer e fagocitar esses microrganismos (Heidari  
254 et al., 2001; Mayadas et al., 2014). No experimento I, o grupo IMR manteve seus níveis de  
255 neutrófilos bastonetes e segmentados elevados em relação ao grupo CTR após aplicação de  
256 pegbovigrastim, sendo que a maioria dos neutrófilos aumentados foram de células maduras,  
257 visto que o G-CSF induz a diferenciação de células progenitoras em fenótipos específicos de  
258 células maduras (Kimura et al. 2014). Esse aumento de neutrófilos pode ser devido ao  
259 pegbovigrastim ser uma forma modificada da citocina imunorreguladora bG-CSF, a qual é  
260 responsável por aumentar os níveis de neutrófilos circulantes durante processos inflamatórios  
261 (Kehrli et al., 1991; Canning et al., 2017), podendo assim aumentar a capacidade de proteção  
262 contra infecções que acometem os animais durante o período de cria.

263 No segundo experimento, dois grupos foram desafiados com LPS de *Escherichia coli*  
264 visando simular uma resposta inflamatório. A contagem de leucócitos totais e neutrófilos  
265 segmentados no grupo LPS apresentou um pico 24 horas após o desafio, e um decréscimo após  
266 48 horas, demonstrando que o LPS era viável. As células e moléculas que fazem parte do  
267 sistema imune inato apresentam receptores do tipo *Toll-4* (**TLR4**) em sua superfície, que são  
268 responsáveis por detectar determinados padrões moleculares associados aos patógenos  
269 (**PAMPs**), como o LPS (Doan et al., 2008, Delves et al., 2013). Após se ligar aos PAMPs, a  
270 transdução de sinal de um TLR para o núcleo leva ao aumento da ativação de genes que  
271 codificam citocinas e outras moléculas envolvidas na atividade antimicrobiana. Isso resulta na  
272 síntese e secreção de citocinas que promovem a inflamação e o recrutamento de leucócitos para  
273 o sítio da infecção (Doan et al., 2008). Após reconhecer e fagocitar os patógenos, o neutrófilo  
274 entra em apoptose devido a ação das proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos

275 citoplasmáticos e por espécies reativas de oxigênio, tais como superóxido, peróxido de  
276 hidrogênio e radical hidroxil (Lagranha et al., 2008). Esse mecanismo pode explicar o fato do  
277 LPS ter provocado um pico na contagem de neutrófilos após a sua aplicação e logo decair a  
278 níveis basais, visto que essas células têm uma sobrevida curta, de 8 a 10 horas, na corrente  
279 sanguínea (Lagranha et al., 2008).

280 Assim como no experimento I, no segundo experimento o número de leucócitos totais  
281 e neutrófilos segmentados do grupo IMR foi maior do que o grupo CTR, tendo apresentado um  
282 pico 24 horas (D2) após a aplicação de pegbovigrastim e um decréscimo após 48 horas (D3),  
283 mas manteve sua concentração mais elevada até 480 horas (D21) após o tratamento. Estes  
284 resultados foram semelhantes aos encontrados em vacas durante o periparto que receberam  
285 pegbovigrastim 7 dias antes do parto e 24 horas após o parto, onde os neutrófilos se mantiveram  
286 elevados por pelo menos mais 7 dias após a segunda dose (Canning et al., 2017). O aumento da  
287 duração da atividade está associado com a ligação do bG-CSF ao polímero PEG, que permite  
288 uma redução no número de doses necessárias para se obter uma resposta em comparação com  
289 a forma não peguilada (Kehrli et al., 1991; Cullor et al., 1992; Molineux, 2003). Da mesma  
290 forma, o grupo IMR+LPS apresentou maior número de leucócitos totais e neutrófilos  
291 segmentados do que o grupo CTR, porém menor que o grupo IMR. Isso pode ter ocorrido  
292 devido à resposta inflamatória, induzida pelo LPS, fazer com que se tenha um aumento na  
293 mobilização dos leucócitos para os tecidos, resultado em uma menor concentração no grupo  
294 IMR+LPS (Kopaniak and Movat, 1983; Heidari et al., 2001).

295 O perfil metabólico é utilizado para diagnosticar transtornos metabólicos, deficiências  
296 nutricionais e como preventivo de transtornos subclínicos, além da pesquisa de problemas de  
297 saúde e de desempenho de rebanho (Lopes et al., 2017). Não foi encontrado diferença entre os  
298 indicadores renais, hepáticos e proteicos em ambos os experimentos, constatando que, apesar  
299 do pegbovigrastim ter aumentado as células de defesa do organismo, não alterou o metabolismo

300 desses animais. Dessa maneira, o produto poderia ser utilizado em bezerros no início da vida e,  
301 com isso, possivelmente auxiliar na prevenção de doenças que surgem na fase de cria, em um  
302 momento onde há uma baixa concentração de anticorpos maternos, obtidos pelo colostro,  
303 associado à imaturidade do sistema imune (Chase et al., 2009).

304 Além de poder indicar desequilíbrios nutricionais, os indicadores proteicos têm  
305 demonstrado eficácia na identificação de doenças inflamatórias (Simplício et al., 2013). De  
306 acordo com Simplício et al. (2013), a quantificação de proteínas de fase aguda (PFA) tem sido  
307 útil no prognóstico, diagnóstico e monitoramento de enfermidades nos rebanhos. Dentre essas  
308 proteínas encontram-se a HP, uma PFA positiva que se eleva durante o processo inflamatório,  
309 e a PON1, uma PFA negativa sintetizada no fígado (Krause et al., 2014), que reduz seus níveis  
310 na circulação em resposta às citocinas liberadas durante o processo inflamatório, devido a  
311 menor expressão hepática e à inibição por oxidantes (Bionaz et al., 2007; Giordano et al., 2013).

312 No experimento II, a atividade da PON1 foi maior no grupo IMR do que nos outros  
313 grupos, o que pode indicar uma melhor resposta frente a quadros infecciosos, visto que os  
314 biomarcadores de função hepáticas não foram alteradas. Contudo, o grupo IMR+LPS  
315 apresentou uma menor atividade do que o grupo IMR, demonstrando que a utilização do  
316 pegbovigastim pode obter uma melhor resposta quando utilizado de forma preventiva.

317 As medidas do corpo do animal podem ser influenciadas pela raça, idade, condição  
318 corporal, estado fisiológico e genética (Borger et al., 2017). Para avaliação do desenvolvimento  
319 corporal de bezerros várias medidas são utilizadas, como altura de cernelha, perímetro torácico,  
320 largura da garupa e o GMD, que podem definir quanto ao tamanho do animal, às exigências  
321 nutricionais e à maturidade fisiológica (Frenau e Borjas, 2007). Não encontramos diferenças  
322 entre os parâmetros zootécnicos de bezerras que receberam ou não o imunoestimulante, nem  
323 mesmo quanto ao GMD que poderia estar reduzido no grupo tratamento, visto que as células  
324 imunes necessitam de maior aporte energético (Ingvarsen e Moyes, 2013), demonstrando que

325 o produto não afeta o desenvolvimento do animal no início da vida, tornando-se uma alternativa  
326 à melhora da saúde do animal, o que pode refletir na vida produtiva do mesmo. Apesar do  
327 aumento no número de leucócitos, não observamos diferenças no número de casos de diarreia,  
328 possivelmente devido a baixa quantidade de animais no estudo.

329329

**330**

### **CONCLUSÕES**

331 Os estudos demonstraram que a administração de pegbovigastim em bezerros leiteiros  
332 aumentam o número de neutrófilos circulantes. Além disso, o uso desse imunostimulante não  
333 afetou a saúde hepática e renal dos animais, nem interferiu no metabolismo proteico, assim  
334 como não alterou os parâmetros zootécnicos estudados. Desse modo, o pegbovigastim, quando  
335 aplicado em bezerros, pode aumentar a imunidade do animal, reduzindo a incidência de  
336 doenças, fazendo com que haja um aumento do desempenho produtivo pela redução da idade à  
337 puberdade, e conseqüentemente aumentando a vida útil do animal.

338338

**339**

### **AGRADECIMENTOS**

340 Os autores agradecem a Financiadora de Estudos e Projetos (**FINEP**), a Coordenação  
341 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Conselho Nacional de  
342 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do  
343 Estado do Rio Grande do Sul (**FAPERGS**) pelo apoio financeiro, e as propriedades comerciais  
344 Fazenda Leite Sul e Granjas 4 Irmãos pela disponibilidade dos animais e parceria formada.

**REFERÊNCIAS**

345

- 346 Akbar, H., T. Grala, M. V. Riboni, F. Cardoso, G. Verkerk, J. McGowan, K. Macdonald, J.  
347 Webster, K. Schutz, and S. Meier. 2015. Body condition score at calving affects systemic  
348 and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing  
349 dairy cows. *Journal of dairy science* 98(2):1019-1032.
- 350 Ayrlé, H., M. Mevissen, M. Kaske, H. Nathues, N. Gruetzner, M. Melzig, and M. Walkenhorst.  
351 2016. Medicinal plants—prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and  
352 respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. *BMC veterinary research*  
353 12(1):89.
- 354 Bendall, L. J. and K. F. Bradstock. 2014. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone  
355 marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & growth factor reviews* 25(4):355-367.
- 356 Bionaz, M., E. Trevisi, L. Calamari, F. Librandi, A. Ferrari, and G. Bertoni. 2007. Plasma  
357 paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows.  
358 *Journal of Dairy Science* 90(4):1740-1750.
- 359 Bobbo, T., P. Ruegg, E. Fiore, M. Giancesella, M. Morgante, D. Pasotto, L. Gallo, G. Bittante,  
360 and A. Cecchinato. 2017. Association between udder health status and blood serum  
361 proteins in dairy cows. *Journal of dairy science*.
- 362 Borger, R. H., A. S. Martins, S. Los Galleto, V. B. Pedrosa, R. A. da Rocha Oliveira, and L. da  
363 Silva Leal. 2017. Performance of dairy calves raised under two breeding systems. *Semina:  
364 Ciências Agrárias* 38(2):867-876.
- 365 Browne, R. W., S. T. Koury, S. Marion, G. Wilding, P. Muti, and M. Trevisan. 2007. Accuracy  
366 and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism  
367 (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clinical Chemistry* 53(2):310-317.
- 368 Canning, P., R. Hassfurther, T. TerHune, K. Rogers, S. Abbott, and D. Kolb. 2017. Efficacy  
369 and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in

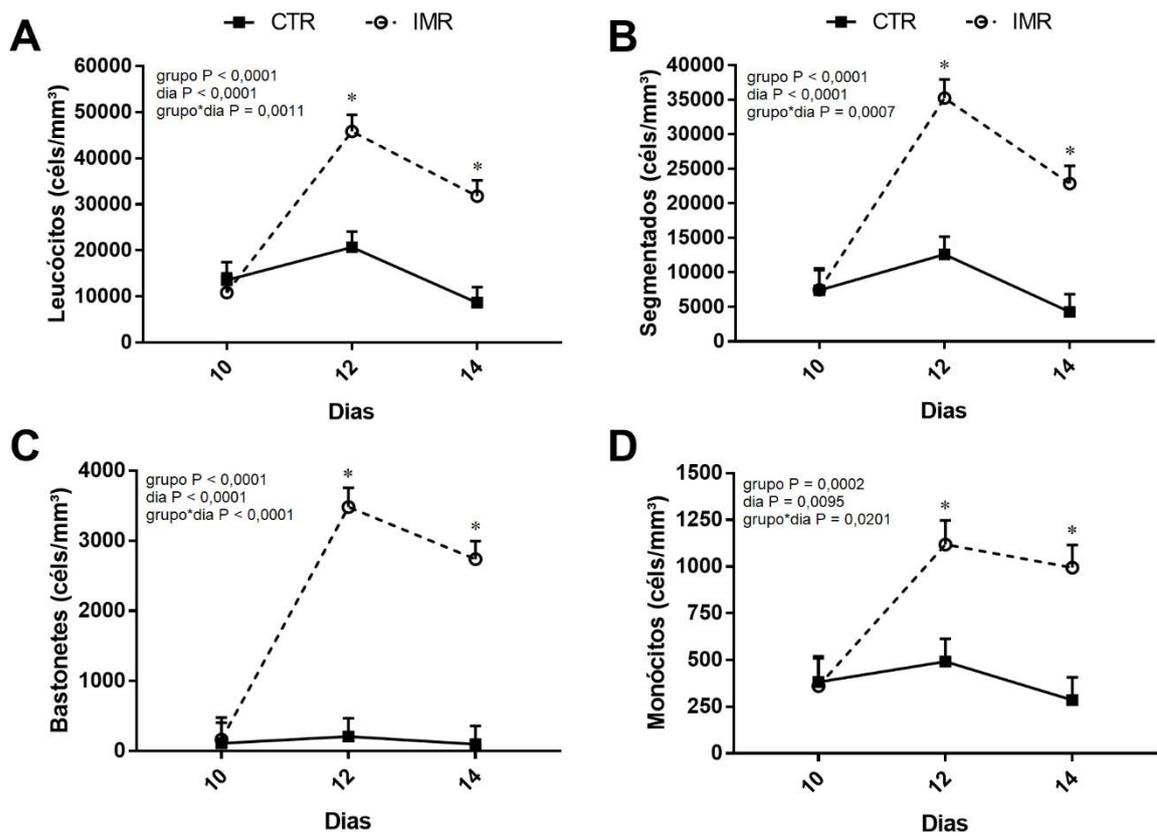
- 370 periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. *Journal of*  
371 *Dairy Science*.
- 372 Chase, C. C., Hurley, D. J., Reber, A. J. 2008. Neonatal immune development in the calf and  
373 its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 24(1), 87-104.
- 374 Cortese, V. S. 2009. Neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal*  
375 *Practice* 25(1):221-227.
- 376 Crisan, T. O., M. C. Cleophas, M. Oosting, H. Lemmers, H. Toenhake-Dijkstra, M. G. Netea,  
377 T. L. Jansen, and L. A. Joosten. 2015. Soluble uric acid primes TLR-induced  
378 proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra.  
379 *Annals of the rheumatic diseases:annrheumdis-2014-206564*.
- 380 Cullor, J., W. Smith, J. Zinkl, J. Dellinger, and T. Boone. 1992. Hematologic and bone marrow  
381 changes after short-and long-term administration of two recombinant bovine granulocyte  
382 colony-stimulating factors. *Veterinary pathology* 29(6):521-527.
- 383 Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. Roitt | *Fundamentos de Imunologia*. 12.  
384 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 552 p.
- 385 Doan, T., Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh, C. *Imunologia Ilustrada*. Porto Alegre:  
386 Artmed, 2008. 334 p.
- 387 Feitosa, F. L. F. 2000. *Semiologia Veterinária: A Arte Do Diagnóstico*. Grupo Gen-Editora  
388 Roca Ltda.
- 389 Frenau, G. E. and A. d. L. R. Borjas. 2007. Estudo de medidas corporais, peso vivo e condições  
390 corporal de fêmeas da raça nelore *Bos taurus indicus* ao longo de doze meses.
- 391 Giordano, A., M. Veronesi, G. Rossi, F. Pezzia, M. Probo, L. Giori, and S. Paltrinieri. 2013.  
392 Serum paraoxonase-1 activity in neonatal calves: Age related variations and comparison  
393 between healthy and sick animals. *The Veterinary Journal* 197(2):499-501.

- 394 Goff, J. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health.  
395 Journal of dairy science 89(4):1292-1301.
- 396 Heidari, M., J. A. Harp, and M. E. Kehrli. 2001. Expression, purification, and in vitro biological  
397 activities of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor. Veterinary  
398 immunology and immunopathology 81(1):45-57.
- 399 Hill, J. A. G., D. W. Costa, M. E. F. de Castro, W. Hartmann, and F. J. Benesi. 2017. Proteína  
400 total, proteinograma eletroforético e gamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de  
401 vida no município de Campo Largo, Paraná. Revista Acadêmica: Ciência Animal 5(3).
- 402 Ingvarsen, K. L. and K. Moyes. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle.  
403 Animal 7(s1):112-122.
- 404 Jerala, R. 2007. Structural biology of the LPS recognition. International Journal of Medical  
405 Microbiology 297(5):353-363.
- 406 Jones, G. and D. Mould. 1984. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to  
407 a microtitration plate system. Research in veterinary science 37(1):87-92.
- 408 Kehrli, M. E., J. S. Cullor, and S. C. Nickerson. 1991. Immunobiology of hematopoietic colony-  
409 stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. Journal of  
410 dairy science 74(12):4399-4412.
- 411 Kimura, K., J. P. Goff, P. Canning, C. Wang, and J. A. Roth. 2014. Effect of recombinant  
412 bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol  
413 injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. Journal of dairy  
414 science 97(8):4842-4851.
- 415 Kopaniak, M. M., & Movat, H. Z. 1983. Kinetics of acute inflammation induced by Escherichia  
416 coli in rabbits. II. The effect of hyperimmunization, complement depletion, and depletion  
417 of leukocytes. The American journal of pathology, 110(1), 13.

- 418 Krause, A. R. T., L. F. Pfeifer, P. Montagner, M. M. Weschenfelder, E. Schwegler, M. E. Lima,  
419 E. G. Xavier, C. C. Brauner, E. Schmitt, and F. A. Del Pino. 2014. Associations between  
420 resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites  
421 and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. *Animal*  
422 *reproduction science* 145(1):8-14.
- 423 Lagranha, C. J., T. M. d. Lima, S. M. Senna, R. Curi, and T. C. Pithon-Curi. 2008. Função e  
424 apoptose do neutrófilo: modulação pela maturação sexual, exercício e suplementação com  
425 glutamina. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento* 13(1):95-108.
- 426 Littell, R., P. Henry, and C. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data  
427 using SAS procedures. *Journal of animal science* 76(4):1216-1231.
- 428 Lopes, K., T de L, R. N. de Lima, A. P. de Assis, M. V. de Miranda, J. M. Ferreira, H. M. d. S.  
429 Leite, D. M. de Lima Júnior, and P. d. O. Lima. 2017. Perfil bioquímico sérico de bezerros  
430 de origem leiteira aleitados com dietas líquidas alternativas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*  
431 35(1):27-32.
- 432 Marconcin, S. A., P. Rose, L. Lenati, and A. V. F. da Silva. 2017. Suplementação de lecitina  
433 de soja na ração de cães: estudo sobre o perfil hematológico. *Revista Acadêmica: Ciência*  
434 *Animal* 7(3).
- 435 Mayadas, T. N., X. Cullere, and C. A. Lowell. 2014. The multifaceted functions of neutrophils.  
436 *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9:181-218.
- 437 McDougall, S., S. LeBlanc, and A. Heiser. 2017. Effect of prepartum energy balance on  
438 neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows. *Journal of*  
439 *Dairy Science* 100(9):7478-7492.
- 440 Molineux, G. 2003. Pegylation: engineering improved biopharmaceuticals for oncology.  
441 *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 23(8P2).

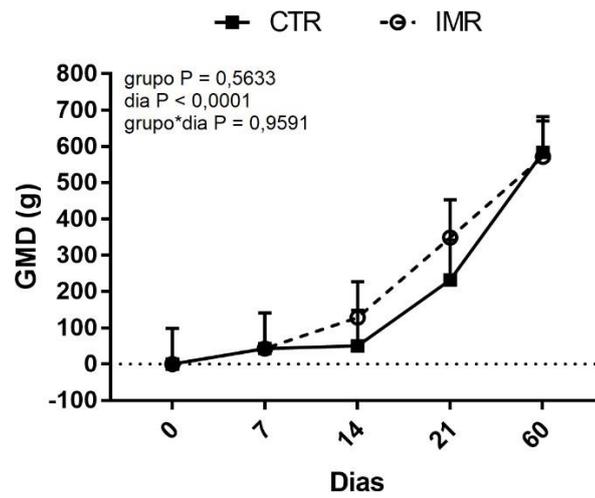
- 442 Nascimento, J. C. d. S., T. G. P. Silva, H. Rizzo, L. B. Fonseca Filho, L. L. da Silva Soares, W.  
443 M. A. de Souza, and M. J. A. A. L. Amorim. 2017. Indicadores bioquímicos e corporais  
444 para avaliação do perfil metabólico e nutricional em ruminantes. *Ciência Veterinária nos*  
445 *Trópicos* 19(3):63-74.
- 446 Peter, A. T. 2013. Bovine placenta: a review on morphology, components, and defects from  
447 terminology and clinical perspectives. *Theriogenology*, 80(7), 693-705.
- 448 Raetz, C. R. and C. Whitfield. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of*  
449 *biochemistry* 71(1):635-700.
- 450 Ruiz, R., L. Tedeschi, and A. Sepúlveda. 2017. Investigation of the effect of pegbovigrastim on  
451 some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds. *Journal of*  
452 *Dairy Science* 100(4):3305-3317.
- 453 Schneider, A., M. Corrêa, and W. Butler. 2013. Acute phase proteins in Holstein cows  
454 diagnosed with uterine infection. *Research in veterinary science* 95(1):269-271.
- 455 Silva, E. B. d., M. C. Soares Fioravanti, L. A. Franco da Silva, E. Gonçalves de Araújo, L.  
456 Borges de Menezes, M. Pacheco Miguel, and D. Vieira. 2008. Característica leucocitária,  
457 relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore,  
458 confinados e terminados a pasto. *Ciência Rural* 38(8).
- 459 Simplício, K., F. Sousa, J. Fagliari, and P. Silva. 2013. Proteinograma sérico, com ênfase em  
460 proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de  
461 ocorrência natural. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*:1339-1347.
- 462 Windeyer, M., K. Leslie, S. Godden, D. Hodgins, K. Lissemore, and S. LeBlanc. 2014. Factors  
463 associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of  
464 age. *Preventive veterinary medicine* 113(2):231-240.

465 Zhang, Q. and H. M. White. 2017. Regulation of inflammation, antioxidant production, and  
466 methyl-carbon metabolism during methionine supplementation in lipopolysaccharide-  
467 challenged neonatal bovine hepatocytes. *Journal of dairy science* 100(10):8565-8577.



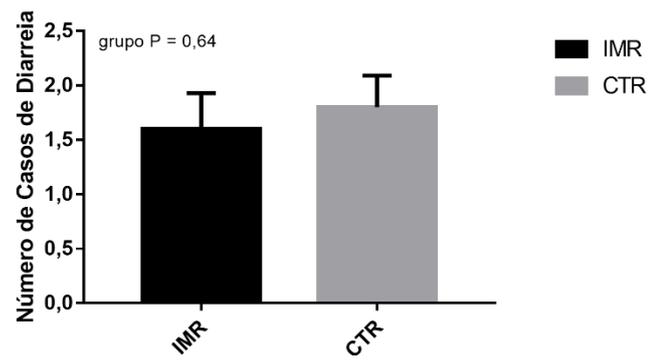
468468

469 **Figura 1.** Valores médios de (A) leucócitos, (B) segmentados, (C) bastonetes e (D) monócitos  
 470 de bezerras avaliadas no dia da aplicação do tratamento (dia 10), 48 horas (dia 12) e 96 horas  
 471 após (dia 14), para os grupos controle (CTR) e tratamento (IMR). (\*) Demonstram diferença  
 472 estatística  $P < 0,05$ .



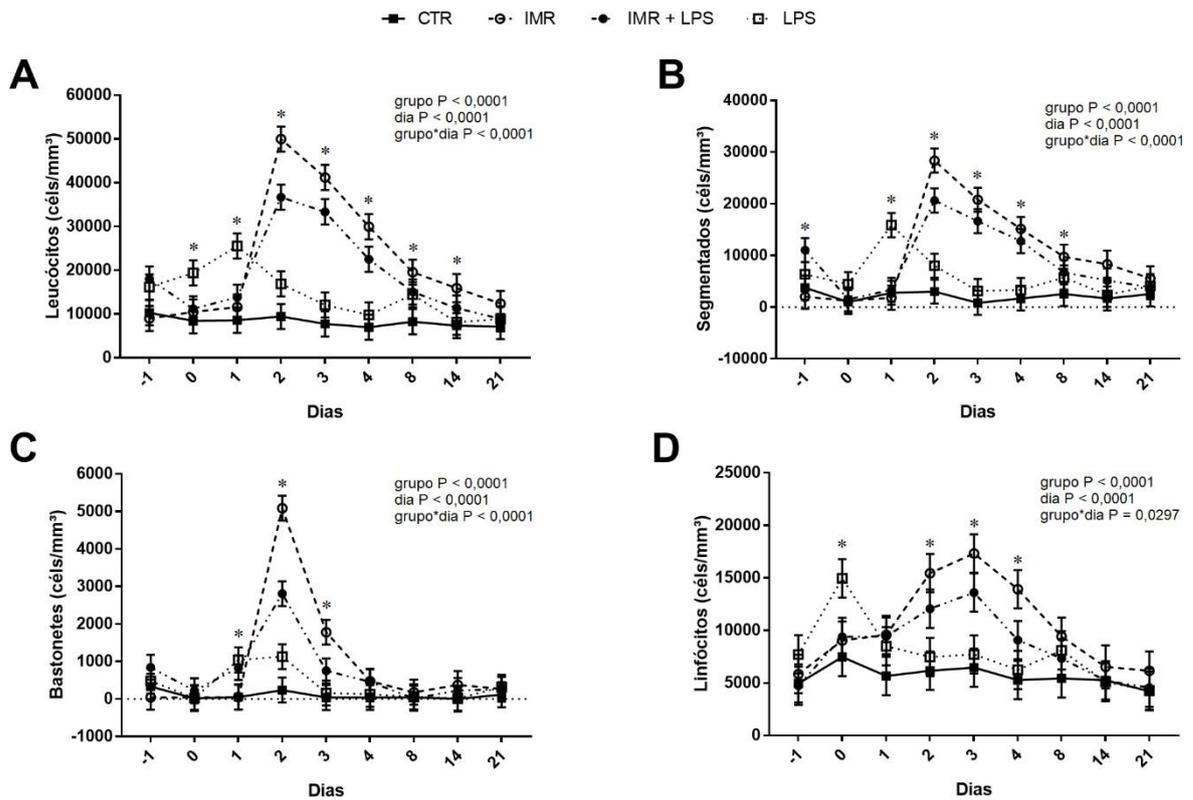
473473

474 **Figura 2.** Valores médios do ganho de peso médio diário (GMD) de bezerras avaliadas nos  
475 primeiros 60 dias de vida, para os grupos controle (CTR) e tratamento (IMR). Foi considerado  
476 diferença estatística  $P < 0,05$ .



477477

478 **Figura 3.** Valores médios do número de casos de diarreia observados nas bezerras nos  
479 primeiros 21 dias de vida, para os grupos tratamento (IMR) e controle (CTR). Foi considerado  
480 diferença estatística  $P < 0,05$ .



481481

482 **Figura 4.** Valores médios de (A) leucócitos, (B) segmentados, (C) bastonetes e (D) linfócitos  
 483 de bezerros avaliados um dia antes da aplicação do lipopolissacarídeo (LPS; dia -1), no dia de  
 484 aplicação do LPS (dia 0), 24 horas (aplicação de pegbovigrastim; dia 1), 48 horas (dia 2), 72  
 485 horas (dia 3), 96 horas (dia 4), 192 horas (dia 8), 336 horas (dia 14) e 504 horas após (dia 21),  
 486 para os grupos controle (CTR) e tratamentos (IMR; IMR+LPS; LPS). (\*) Demonstram  
 487 diferença estatística  $P < 0,05$ .

488 **Tabela 1.** Média  $\pm$  erro médio padrão de parâmetros hematológicos de bezerras avaliadas até  
 489 96 horas após o tratamento, para os grupos controle (CTR) e tratamento (IMR).

Parâmetros	Grupos		Valores de P		
	IMR	CTR	Grupo	Dia	G*D <sup>†</sup>
CHCM (%)	33,26 $\pm$ 1,15	32,07 $\pm$ 1,11	0,46	0,26	0,29
Eosinófilos (cél/mm <sup>3</sup> )	12,67 $\pm$ 8,00	7,63 $\pm$ 7,62	0,65	0,39	0,1
Hemácias (10 <sup>6</sup> / $\mu$ L)	7,83 $\pm$ 0,32	7,95 $\pm$ 0,31	0,78	0,91	0,87
Hemoglobina (g/dL)	10,24 $\pm$ 0,63	9,99 $\pm$ 0,61	0,78	0,64	0,85
Linfócitos (cél/mm <sup>3</sup> )	4632,14 $\pm$ 829,38	5433,83 $\pm$ 789,62	0,49	0,25	0,36
RDW (%)	18,67 $\pm$ 0,63	18,12 $\pm$ 0,62	0,54	0,01	0,27
VCM (fL)	39,22 $\pm$ 0,78	39,10 $\pm$ 0,75	0,91	0,63	0,69

490 CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW = amplitude de distribuição  
 491 dos glóbulos vermelhos; VCM = volume corpuscular médio.

492 <sup>†</sup>G\*D = interação entre grupo e o dia.

493 Foi considerado diferença estatística P < 0,05.

494 **Tabela 2.** Média  $\pm$  erro médio padrão de parâmetros bioquímicos de bezerras avaliadas até 96  
 495 horas após o tratamento, para os grupos controle (CTR) e tratamento (IMR).

Parâmetros	Grupos		Valores de P		
	CTR	IMR	Grupo	Dia	G*D <sup>†</sup>
ALB (g/dL)	2,72 $\pm$ 0,07	2,58 $\pm$ 0,07	0,15	0,26	0,13
AST (U/L)	29,63 $\pm$ 1,54	28,99 $\pm$ 1,57	0,77	0,77	0,56
CREAT (mg/dL)	1,63 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,05	0,29	0,82	0,60
GGT (U/L)	115,80 $\pm$ 29,97	178,88 $\pm$ 30,52	0,15	0,66	0,95
GLO (g/dL)	4,13 $\pm$ 0,22	4,34 $\pm$ 0,23	0,51	0,27	0,83
HP (g/L)	0,56 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,05	0,33	0,62	0,95
PON1 (U/mL)	28,93 $\pm$ 2,42	29,09 $\pm$ 2,24	0,96	0,14	0,23
PPT (g/dL)	6,86 $\pm$ 0,21	6,92 $\pm$ 0,21	0,82	0,47	0,95
URE (mg/dL)	28,17 $\pm$ 1,07	26,42 $\pm$ 1,09	0,26	0,28	0,11

496 ALB = albumina; AST = aspartato aminotransferase; CREAT = creatinina; GGT = gama  
 497 glutamil transferase; GLO = globulinas; HP = haptoglobina; PON1 = paraoxonase 1; PPT =  
 498 proteínas plasmáticas totais; URE = ureia.

499 <sup>†</sup>G\*D = interação entre grupo e o dia.

500 Foi considerado diferença estatística  $P < 0,05$ .

501 **Tabela 3.** Média  $\pm$  erro médio padrão de parâmetros zootécnicos de bezerras avaliadas nos  
 502 primeiros 60 dias de vida, para os grupos controle (CTR) e tratamento (IMR).

Variáveis	-	Grupos		Valores de P		
		IMR	CTR	Grupo	Dia	G*D <sup>†</sup>
Altura de cernelha (cm)		80,11 $\pm$ 0,41	80,52 $\pm$ 0,42	0,49	<0,0001	0,73
Perímetro torácico (cm)		81,10 $\pm$ 0,48	81,42 $\pm$ 0,48	0,64	<0,0001	0,99
Largura de garupa (cm)		21,38 $\pm$ 0,17	21,45 $\pm$ 0,17	0,76	<0,0001	0,75

503 <sup>†</sup>G\*D = interação entre grupo e o dia.

504 Foi considerado diferença estatística  $P < 0,05$ .

505 **Tabela 4.** Média  $\pm$  erro médio padrão de parâmetros hematológicos de bezerros avaliados durante o período experimental, para os grupos controle  
 506 (CTR) e tratamentos (IMR; IMR + LPS; LPS).

Parâmetros	Grupos				Valores de P		
	CTR	IMR	IMR+LPS	LPS	Grupo	Dia	G*D <sup>†</sup>
Eosinófilos (céls/mm <sup>3</sup> )	92,47 $\pm$ 74,45	214,19 $\pm$ 75,48	300,96 $\pm$ 74,45	138,31 $\pm$ 74,45	0,22	0,0015	0,56
Fibrinogênio (mg/dL)	221,11 $\pm$ 22,99	202,22 $\pm$ 22,99	161,67 $\pm$ 22,99	173,33 $\pm$ 22,99	0,25	<0,0001	0,99
Hematócrito (%)	35,78 $\pm$ 0,75	34,09 $\pm$ 0,75	34,11 $\pm$ 0,75	36,31 $\pm$ 0,75	0,08	<0,0001	0,99
Monócitos (céls/mm <sup>3</sup> )	240,8 $\pm$ 74,76	392,95 $\pm$ 75,79	538,00 $\pm$ 74,76	401,53 $\pm$ 74,76	0,05	<0,0001	0,82
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	11210 $\pm$ 420,46	10453 $\pm$ 420,46	10719 $\pm$ 420,46	11557 $\pm$ 420,46	0,25	0,0003	0,90

507 RBC = contagem de glóbulos vermelhos.

508 <sup>†</sup>G\*D = interação entre grupo e o dia.

509 Foi considerado diferença estatística P < 0,05.

510 **Tabela 5.** Média  $\pm$  erro médio padrão de parâmetros bioquímicos de bezerros avaliados durante o período experimental, para os grupos controle  
511 (CTR) e tratamentos (IMR; IMR + LPS; LPS).

Parâmetros	Grupos				Valores de P		
	CTR	IMR	IMR+LPS	LPS	Grupo	Dia	G*D <sup>†</sup>
ALB (g/dL)	2,50 $\pm$ 0,05 <sup>AC</sup>	2,57 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	2,38 $\pm$ 0,05 <sup>BC</sup>	2,32 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	0,0007	0,0001	0,89
AST (U/L)	58,84 $\pm$ 2,38 <sup>A</sup>	62,86 $\pm$ 2,40 <sup>A</sup>	41,09 $\pm$ 2,37 <sup>B</sup>	48,42 $\pm$ 2,40 <sup>C</sup>	<0,0001	0,13	0,90
CREAT (mg/dL)	0,92 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>	0,92 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,85 $\pm$ 0,03 <sup>AB</sup>	0,02	<0,0001	0,59
GGT (U/L)	27,00 $\pm$ 3,04 <sup>B</sup>	26,12 $\pm$ 3,09 <sup>B</sup>	38,78 $\pm$ 3,04 <sup>A</sup>	24,41 $\pm$ 3,09 <sup>B</sup>	0,0042	0,59	0,99
GLO (g/dL)	2,72 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>	2,40 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>	2,66 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>	2,81 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>	0,24	0,11	0,67
HP (g/L)	0,66 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup>	0,76 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup>	0,72 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup>	0,75 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup>	0,82	0,06	0,48
PCR (mg/L)	0,61 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	0,71 $\pm$ 0,05 <sup>AB</sup>	0,72 $\pm$ 0,05 <sup>AB</sup>	0,83 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	0,03	0,0028	0,56
PON1 (U/mL)	84,00 $\pm$ 6,24 <sup>B</sup>	105,53 $\pm$ 6,24 <sup>A</sup>	73,77 $\pm$ 6,24 <sup>B</sup>	82,03 $\pm$ 6,24 <sup>B</sup>	0,02	0,10	0,74
PPT (g/dL)	5,23 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	4,97 $\pm$ 0,13 <sup>A</sup>	5,05 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	5,13 $\pm$ 0,13 <sup>A</sup>	0,52	0,03	0,55
URE (mg/dL)	33,89 $\pm$ 1,08 <sup>A</sup>	33,76 $\pm$ 1,09 <sup>A</sup>	29,69 $\pm$ 1,08 <sup>B</sup>	33,01 $\pm$ 1,09 <sup>AB</sup>	0,02	0,0039	0,89

512 ALB = albumina; AST = aspartato aminotransferase; CREAT = creatinina; GGT = gama glutamil transferase; GLO = globulinas; HP =  
513 haptoglobina; PCR = proteína C reativa; PON1 = paraoxonase 1; PPT = proteínas plasmáticas totais; URE = ureia.

514 Letras maiúsculas indicam diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

515 <sup>†</sup>G\*D = interação entre grupo e o dia.

## **5 Conclusão**

A administração de pegbovigrastim foi capaz de aumentar o número de leucócitos totais, principalmente pelo aumento de neutrófilos circulantes, podendo deixar os bezerros mais imunocompetentes frente a patógenos. Além disso, não foi encontrado diferenças significativas em parâmetros bioquímicos, demonstrando que o produto pode não interferir na saúde hepática ou renal desses animais, nem no metabolismo proteico. Desse modo, o pegbovigrastim, quando aplicado em bezerros, pode aumentar a imunidade do animal, reduzindo a incidência de doenças, fazendo com que haja um aumento do desempenho produtivo pela redução da idade à puberdade, e conseqüentemente aumentando a vida útil do animal.

## Referências

ALEXANDER, C; RIETSCHER, E. T. Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of endotoxin research**, v. 7, n. 3, p. 167-202, 2001. ISSN 0968-0519.

AKBAR, H. et al. Body condition score at calving affects systemic and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 2, p. 1019-1032, 2015. ISSN 0022-0302.

AYRLE, H. et al. Medicinal plants—prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 89, 2016. ISSN 1746-6148.

AZIZADEH, M. et al. Factors affecting calf mortality in Iranian Holstein dairy herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 104, n. 3, p. 335-340, 2012. ISSN 0167-5877.

BARTELS, C. J. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive veterinary medicine**, v. 93, n. 2, p. 162-169, 2010. ISSN 0167-5877.

BATISTA, C. et al. Desempenho e saúde de bezerras alimentadas com leite sem resíduo de drogas antimicrobianas ou leite de vacas tratadas contra mastite adicionado ou não de probiótico. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 60, n. 1, p. 185-191, 2008.

BENDALL, L. J.; BRADSTOCK, K. F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 4, p. 355-367, 2014. ISSN 1359-6101.

BERGE, A. et al. Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 286-295, 2009. ISSN 0022-0302.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1740-1750, 2007. ISSN 0022-0302.

BLUM, J. Nutritional physiology of neonatal calves. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 90, n. 1-2, p. 1-11, 2006. ISSN 1439-0396.

BOBBO, T. et al. Association between udder health status and blood serum proteins in dairy cows. **Journal of dairy science**, 2017. ISSN 0022-0302.

BORGER, R. H. et al. Performance of dairy calves raised under two breeding systems. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 867-876, 2017. ISSN 1679-0359.

BOWLAND, S. L.; SHEWEN, P. E. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 33, 2000.

BROWNE, R. W. et al. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 310-317, 2007. ISSN 0009-9147.

CANNING, P. et al. Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. **Journal of Dairy Science**, 2017. ISSN 0022-0302.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012. ISSN 1874-3919.

CHASE, C. C.; 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, n. 1, p. 87-104, 2008. ISSN 0749-0720.

CHEN, J.-Q.; SZODORAY, P.; ZEHER, M. Toll-like receptor pathways in autoimmune diseases. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2016. ISSN 1080-0549.

CHO, Y.-I.; YOON, K.-J. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal of veterinary science**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2014. ISSN 1229-845X.

COELHO, S. G. Desafios na criação e saúde de bezerros. **Ciência Animal Brasileira**, p. 1-16, 2009. ISSN 1809-6891.

CORTESE, V. S. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 221-227, 2009. ISSN 0749-0720.

CRISAN, T. O. et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. **Annals of the rheumatic diseases**, p. annrheumdis-2014-206564, 2015. ISSN 0003-4967.

CRUZ-MACHADO, S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. **Revista de Biologia da USP**, v. 4, p. 40-43, 2010.

CULLOR, J. et al. Hematologic and bone marrow changes after short-and long-term administration of two recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factors. **Veterinary pathology**, v. 29, n. 6, p. 521-527, 1992. ISSN 0300-9858.

DONOVAN, G. A. et al. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Preventive veterinary medicine**, v. 34, n. 1, p. 31-46, 1998. ISSN 0167-5877.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A Arte Do Diagnóstico**. Grupo Gen- Editora Roca Ltda., 2000. ISBN 8541204545.

FEITOSA, F. L. F. et al. Determinação do perfil bioquímico renal sérico de bezerros holandeses e mestiços, na região de Araçatuba/SP. **Ciência Animal Brasileira**, p. 255-260, 2009. ISSN 1809-6891.

FORTUOSO, B. F. et al. Homeopathic treatment as an alternative prophylactic to minimize bacterial infection and prevent neonatal diarrhea in calves. **Microbial Pathogenesis**, 2017. ISSN 0882-4010.

FRENAU, G. E.; BORJAS, A. D. L. R. Estudo de medidas corporais, peso vivo e condições corporal de fêmeas da raça nelore *Bos taurus indicus* ao longo de doze meses. 2007.

GIORDANO, A. et al. Serum paraoxonase-1 activity in neonatal calves: Age related variations and comparison between healthy and sick animals. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 499-501, 2013. ISSN 1090-0233.

GOFF, J. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1292-1301, 2006. ISSN 0022-0302.

GOMES, V. et al. Colostro bovino: muito além das imunoglobulinas. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, n. Suppl 2, p. 99-108, 2017. ISSN 1981-4178.

GONÇALVES, R. C. et al. Influência da suplementação de vitamina E na profilaxia e tratamento da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 127-135, 2011. ISSN 0100-736X.

GONZALEZ, D. D.; SANTOS, M. J. D. Bovine colostrum cells—the often forgotten component of colostrum. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 250, n. 9, p. 998-1005, 2017.

GRAAF, D. C. D. et al. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1269-1287, 1999. ISSN 0020-7519.

GUIMARÃES DE BRITO, B. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de Escherichia coli uropatogênicas UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, 2004. ISSN 0103-8478.

HANG, B. et al. Oral administration of Escherichia coli lipopolysaccharide enhances the immune system of striped catfish, Pangasianodon hypophthalmus (Sauvage). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 4, p. 1299-1308, 2016. ISSN 1365-2109.

HASSFURTHER, R. L.; TERHUNE, T. N.; CANNING, P. C. Efficacy of polyethylene glycol–conjugated bovine granulocyte colony-stimulating factor for reducing the incidence of naturally occurring clinical mastitis in periparturient dairy cows and heifers. **American journal of veterinary research**, v. 76, n. 3, p. 231-238, 2015.

HEIDARI, M.; HARP, J. A.; KEHRLI, M. E. Expression, purification, and in vitro biological activities of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 81, n. 1, p. 45-57, 2001. ISSN 0165-2427.

HILL, J. A. G. et al. Proteína total, proteinograma eletroforético e gamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de Campo Largo, Paraná. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 5, n. 3, 2017. ISSN 1981-4178.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, v. 7, n. s1, p. 112-122, 2013. ISSN 1751-7311.

JACOBSEN, S. et al. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3330-3339, 2004. ISSN 0022-0302.

JONES, G.; MOULD, D. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. **Research in veterinary science**, v. 37, n. 1, p. 87-92, 1984. ISSN 0034-5288.

KEHRLI, M. E.; CULLOR, J. S.; NICKERSON, S. C. Immunobiology of hematopoietic colony-stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 12, p. 4399-4412, 1991. ISSN 0022-0302.

KIMURA, K. et al. Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 8, p. 4842-4851, 2014. ISSN 0022-0302.

KINDLEIN, L. et al. Bovine colostrum enriched with lyophilized bovine colostrum stimulates intestinal epithelium renewal of Holstein calves in the first days of life. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2017. ISSN 1439-0396.

KRAUSE, A. R. T. et al. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1, p. 8-14, 2014. ISSN 0378-4320.

LAGRANHA, C. J. et al. Função e apoptose do neutrófilo: modulação pela maturação sexual, exercício e suplementação com glutamina. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 1, p. 95-108, 2008. ISSN 0103-1716.

LITTELL, R.; HENRY, P.; AMMERMAN, C. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of animal science**, v. 76, n. 4, p. 1216-1231, 1998. ISSN 0021-8812.

LOPES, K., T DE L et al. Perfil bioquímico sérico de bezerros de origem leiteira aleitados com dietas líquidas alternativas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 27-32, 2017. ISSN 1678-5150.

MARCONCIN, S. A. et al. SUPLEMENTAÇÃO DE LECITINA DE SOJA NA RAÇÃO DE CÃES: estudo sobre o perfil hematológico. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 7, n. 3, 2017. ISSN 1981-4178.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181-218, 2014. ISSN 1553-4006.

MCDougall, S.; LeBlanc, S.; Heiser, A. Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7478-7492, 2017. ISSN 0022-0302.

Meganck, V. et al. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 118, n. 1, p. 64-70, 2015. ISSN 0167-5877.

Molineux, G. Pegylation: engineering improved biopharmaceuticals for oncology. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 23, n. 8P2, 2003. ISSN 1875-9114.

Motta, R. G. et al. Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 417-423, 2015. ISSN 0100-736X.

Nascimento, J. C. D. S. et al. Indicadores bioquímicos e corporais para avaliação do perfil metabólico e nutricional em ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 19, n. 3, p. 63-74, 2017. ISSN 1415-6326.

Peter, A. T. Bovine placenta: a review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693-705, 2013. ISSN 0093-691X.

Raetz, C. R.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635-700, 2002. ISSN 0066-4154.

Roberts, C. J.; Darrington, R. T.; Whitley, M. B. Irreversible aggregation of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor (bG-CSF) and implications for predicting protein shelf life. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, n. 5, p. 1095-1111, 2003. ISSN 1520-6017.

Ruiz, R.; Tedeschi, L.; Sepúlveda, A. Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3305-3317, 2017. ISSN 0022-0302.

Santurio, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011. ISSN 1678-4596.

SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M.; BUTLER, W. Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 269-271, 2013. ISSN 0034-5288.

SILVA, E. B. D. et al. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, 2008. ISSN 0103-8478.

SIMPLÍCIO, K. et al. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1339-1347, 2013. ISSN 0102-0935.

SNOWDER, G. et al. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. **Journal of animal science**, v. 84, n. 8, p. 1999-2008, 2006. ISSN 1525-3163.

UHDE, F. L. et al. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. **The Veterinary record**, v. 163, n. 12, p. 362-366, 2008. ISSN 0042-4900.

WINDEYER, M. et al. 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, 2014. ISSN 0167-5877.

ZHANG, Q.; WHITE, H. M. Regulation of inflammation, antioxidant production, and methyl-carbon metabolism during methionine supplementation in lipopolysaccharide-challenged neonatal bovine hepatocytes. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 10, p. 8565-8577, 2017. ISSN 0022-0302.

**ANEXO**

Pelotas, 12 de janeiro de 2017

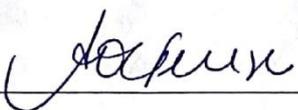
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Quantificação de neutrófilos após a aplicação de imunostimulante Pegfilgrastim em bovinos submetidos a desafio com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS)**” registrada com o nº 23110.009382/2016-61, sob a responsabilidade de **Eduardo Schmitt** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, *ad referendum* em 12/01/2017.

Finalidade	( X ) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	20/01/2017 a 01/01/2018
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Holandês
Nº de animais	20
Idade	1-60 dias
Sexo	Machos
Origem	Centro Agropecuário da Palma - UFPel

**Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.**

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEA 9382-2016).

  
\_\_\_\_\_  
**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**  
*Presidente da CEEA*

Ciente em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2017

Assinatura do Professor Responsável: \_\_\_\_\_