

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós Graduação em Zootecnia



Dissertação

Preditores de doenças e desempenho zootécnico em bezerras leiteiras

ISMAEL MATEUS CAVAZINI

Pelotas, 2016

Catálogo na fonte
Gabriela Machado Lopes CRB: 10/184

C111p Cavazini, Ismael Mateus

Preditores de doenças e desempenho zootécnico em bezerras leiteiras / Ismael Mateus Cavazini ; Francisco Augusto BurKlet Del Pino, orientador ; Viviane Rohrig Rabassa, coorientadora. — Pelotas, 2016.

91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Diarreia. 2. Broncopneumonia. 3. Bezerros. 4. Paraopebense. I. Pino, Francisco Augusto BurKlet Del, orient. II. Rabassa, Viviane Rohrig, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Preditores de doenças e desempenho zootécnico em bezerras leiteiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção animal: ênfase em neonatos bovinos).

Orientador: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Co-orientadores: Dr. Eduardo Schmitt
Dr. Marcio Nunes Correa
Dra. Viviane Rohrig Rabassa

Pelotas, 2016

Banca examinadora: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Dr. Carlos Castilho de Barros

Dra. Beatriz Riet Corrêa

Dra. Raquel Raimundo

Suplente: Dr. Joabel Tonello

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram na realização desse trabalho, e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. O sucesso de mais esta etapa é resultado da confiança e força de cada um de vocês (família, amigos e professores);

Aos meus pais Vitor e Elvira por todo o esforço, dedicação e apoio incondicional para que eu chegasse até aqui, pelo apoio nos momentos difíceis e por sempre acreditarem em mim, enfim por tornarem o meu sonho o nosso também;

Aos meus amigos queridos, que mesmo tendo que superar minha ausência em vários momentos sempre me incentivaram, muito de tudo que idealizo em minha vida é para que vocês se orgulhem de mim!

Ao Dr. Francisco Del Pino pela orientação. Ao Prof. Marcio Correa pela oportunidade de participar do NUPEEC e crescer tanto pessoalmente como profissionalmente, além dos conselhos e amizade de sempre, à co-orientadora Viviane Rabassa pelas muitas revisões de artigos e da dissertação juntamente com a pós doutora Carolina Jacometo;

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária, pelos momentos agradáveis e pela troca de experiências, certamente vocês tornaram esse período mais leve com a cumplicidade diária e troca de conhecimento durante esse tempo; e aos graduandos que se propuseram a auxiliar nosso projeto, tornando-o possível, o auxílio e a amizade de vocês foi imprescindível.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia e a UFPel pela oportunidade de efetuar meu mestrado por esse programa e essa Universidade;

À Granja 4 Irmãos, desde o gerente administrativo Eduardo Xavier aos funcionários da leitaria. Obrigado por tudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de nível Superior –Capes- pela concessão da bolsa. À Fapergs pelo suporte financeiro recebido para a realização deste trabalho;

E, finalmente, a Deus por me permitir estar aqui, Muito Obrigado!

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

CAVAZINI. Ismael Mateus. **Preditores de doenças e desempenho zootécnico em bezerras leiteiras**. 2016. 90f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. A diarreia neonatal bovina e a broncopneumonia são doenças que causam grandes prejuízos. O diagnóstico precoce dessas enfermidades se torna fundamental para estabelecer um rápido e adequado protocolo terapêutico. O objetivo deste estudo foi determinar a resposta metabólica, inflamatória e desempenho zootécnico de neonatos bovinos acometidos de infecções entéricas e respiratórias, bem como determinar possíveis marcadores para diagnóstico precoce e monitoramento da evolução clínica destas alterações. Foram utilizadas 36 bezerras da raça Holandês, monitoradas do nascimento até 42 dias de vida, biópsias hepáticas foram realizadas ao nascimento e coletas de sangue periódicas até o diagnóstico de broncopneumonia ou diarreia neonatal, bem como avaliação zootécnica semanal. Durante o estudo 6 bezerras se mantiveram saudáveis, 12 apresentaram broncopneumonia e 18 apresentaram diarreia. No período anterior ao acometimento clínico os animais foram avaliados quanto aos níveis séricos de GGT, PPT, albumina, paraoxonase e haptoglobina, de forma a identificar marcadores preditivos da ocorrência de enfermidades neonatais. Ao nascimento foi avaliada a expressão hepática dos genes GHR1A, IGF1, STAT3, NFKB1 e SOD2. Após o diagnóstico de diarreia as bezerras foram submetidas a diferentes tratamentos e avaliada a sua resposta clínica, através da análise sanguínea de paraoxonase, haptoglobina, GGT, PPT, albumina, globulina, cloretos, sódio, potássio, glicose, bicarbonato e uréia, além do cálculo do ânion gap e osmolaridade. Não houve alteração na expressão dos genes avaliados em relação a ocorrência de doenças, assim como não houve diferença quanto aos parâmetros zootécnicos. A paraoxonase se mostrou um importante marcador preditivo de doenças neonatais, pois demonstrou-se alterada antes mesmo do surgimento dos sinais clínicos das doenças. Quanto aos tratamentos utilizados nos quadros de diarreia, o uso de antibiótico associado a reposição energética e eletrolítica por via oral mostrou os melhores resultados em termos de perfil metabólico e condição inflamatório do neonato. Nosso estudo foi eficaz na determinação de paraoxonase como preditor diagnóstico para diarreia e broncopneumonia e avaliação da eficiência da solução de reposição oral em protocolos terapêuticos para diarreia neonatal bovina.

Palavras chave: Diarreia, broncopneumonia, bezerros, paraoxonase.

ABSTRACT

CAVAZINI. Ismael Mateus. **Predictors of diseases and growth performance in milk calf.** 2016. 90f. Thesis (Master). Graduate Program in Animal Sciences. Federal University of Pelotas, Brazil. **ABSTRACT:** Neonatal calves diarrhea and bronchopneumonia are diseases that cause great losses. The early diagnostic of these diseases becomes crucial to establish a fast and suitable therapeutic protocol. The objective of this study was to determine the metabolic and immune response of neonatal cattle affected with enteric and respiratory infections, as well as determining possible markers for early diagnosis and monitoring. For this study 36 Holsteins calves were monitored from birth until 42 days of life. Liver biopsies were performed at birth and regular blood collections until the diagnosis of bronchopneumonia or neonatal diarrhea, as well as weekly measurements of growth performance. During the study, 6 calves kept healthy, 12 had bronchopneumonia and 18 had diarrhea. In the previous period of clinical symptoms, serum concentrations of TGG, TPP, albumin, paraoxonase and haptoglobin were measured to identify predictive markers of the occurrence of neonatal diseases. At birth, the hepatic expression of GHR1A, IGF1, STAT3, NFKB1 and SOD2 were evaluated. After the diagnosis of diarrhea the calves were submitted to different treatments and evaluate their clinical response, through blood analysis of paraoxonase, haptoglobin, TPP, TTG, albumin, globulin, chlorides, sodium, potassium, glucose, bicarbonate and urea, as well the calculation of osmolarity and anion gap. The expression of all evaluated genes were not altered regarding the diseases occurrence, as well as there was no difference in the performance parameters. The paraoxonase seemed to be an important predictive marker of neonatal diseases, as it was altered even before the clinical signal of the diseases. Regarding the treatment used in diarrhea diseases, antibiotic use associated with orally energy and electrolytic replacement showed the best results in terms of metabolic profile and inflammatory condition on the neonate. Our study was effective in determining paraoxonase as a predictor for diarrhea and pneumonia diagnosis and assessment of oral replacement solution efficiency in therapeutic protocols for neonatal calves diarrhea.

Key words: Diarrhea, bronchopneumonia, calves, paraoxonase.

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	10
2. Objetivo Geral.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivos Específicos	Erro! Indicador não definido.
3. Projeto de pesquisa.....	17
4. Relatório de trabalho de campo	34
5. Artigo 1	36
6. Artigo 2	Erro! Indicador não definido.
7. Conclusão geral.....	Erro! Indicador não definido.6
8. Referências	Erro! Indicador não definido.

1. Introdução geral

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes atividades de produção do complexo agroindustrial brasileiro. Segundo o IBGE (2015), a produção leiteira em 2014 foi de 37 bilhões de litros de leite, indicando assim uma variação positiva de 35% com relação ao ano de 2007. Em termos de participação regional tem-se que o Sudeste do país concentrou 41,4% da aquisição de leite cru e o Sul 33,8%. Essa produção tem uma contribuição maior de alguns estados, sendo eles: Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás. Devido à importância da cadeia produtiva de leite para a região sul, surge uma preocupação sobre a sustentabilidade dos sistemas de produção. A atividade leiteira tem evoluído de um modelo tradicional de produção para outro mais competitivo, exigindo das instituições de pesquisa e desenvolvimento, agências de fomento e de assistência técnica e extensão rural soluções mais ágeis para se obter aumento da produção e custos decrescentes em bases sustentáveis (Motta et al, 2015).

A pecuária nacional, particularmente a bovinocultura, apresenta vários pontos de estrangulamento, sendo um deles a mortalidade de bezerros no primeiro mês de vida, a qual contribui de modo significativo para aumentar os custos da produção (Benezi et al, 2012). Um dos principais pontos críticos da produção de leite se dá na cria de bezerras, que serão as futuras vacas lactantes do rebanho leiteiro. Qualquer problema durante seu desenvolvimento pode prejudicar o potencial produtivo ou atrasar o ingresso destes animais à produção (Garcia et al, 2013). O processo produtivo na bovinocultura leiteira é composto por várias classes de animais, sendo todas interdependentes, de tal forma que o fracasso em uma delas acarreta prejuízos significantes na produção leiteira de uma propriedade (Santos et al., 2001). Ainda, a criação de bezerros é uma das fases de grande importância na exploração leiteira e está altamente correlacionada com a melhoria genética e com a função econômica da exploração. O seu sucesso exige do criador, além de conhecimentos fisiológicos e nutricionais, práticas de manejo que devem ser adotadas de acordo com os objetivos do sistema de produção (Lopes et al, 2009). Neste contexto, a primeira semana constitui na fase mais crítica da vida

da bezerraleiteira. Em torno de 50% das perdas do primeiro ano de vida ocorrem neste período, onde a saúde da mesma é fortemente influenciada pela higiene ambiental (Lopes et al, 2009).

De acordo com Campos et al. (2005), os principais tipos de instalações para bezerros são: sistemas convencionais de baias fixas, em galpão próprio ou dentro de estábulo, sistema de abrigos individuais móveis e sistema de liberdade, no qual os bezerros são criados soltos no pasto. A individualização dos animais facilita a alimentação, evita problemas de dominância, permite melhor controle da saúde, reduz problemas como diarreia, tendo como desvantagem o uso de coleiras ou correntes. Já em sistemas de confinamento, a ventilação é de fundamental importância para o sucesso da criação de bezerros, pois esses animais estão susceptíveis a infecções causadas por bactérias e vírus, agentes patogênicos disseminados por aerossóis. A ventilação correta promove a remoção de gases e umidade que estressam os animais, aumentando o vigor dos animais e reduzindo problemas respiratórios (Coelho & Carvalho, 2006). Assim, todo sistema de criação apresenta vantagens e desvantagens, podendo influenciar na saúde da bezerra.

Quanto à exposição aos agentes patogênicos, os neonatos são capazes de montar uma resposta imune contra doenças que possam vir a acometê-los logo após o nascimento, no entanto, seu sistema imune ainda não é desenvolvido e qualquer resposta acaba sendo lenta e com baixas concentrações de anticorpos. Portanto, a menos que seja providenciada uma assistência imunológica fornecida pelo colostro, os animais recém-nascidos têm grande probabilidade de adquirir doenças infecciosas, podendo vir a óbito. Essa assistência imunológica se dá através da imunidade passiva conferida pelos anticorpos transferidos da mãe para o neonato através do colostro (Mcguirk & Collins, 2004).

Além do seu conteúdo de imunoglobulinas, o colostro contém quantidades consideravelmente maiores de proteínas, gorduras, vitaminas e minerais do que o leite, sendo especialmente importante a transferência das vitaminas lipossolúveis. Ele possui efeitos anabólicos e os animais que ingerem o colostro têm vigor maior do que os privados da sua ingestão (Radostitis et al., 2007). Sendo assim, durante as primeiras semanas de vida, a saúde do neonato é extremamente dependente da transferência de imunidade passiva e do ambiente onde este animal é criado, influenciando na ocorrência de distúrbios, principalmente do trato digestivo e

respiratório (Climeni, 2008). Os distúrbios entéricos e respiratórios, como a diarreia e broncopneumonia, representam prejuízos econômicos para a pecuária bovina de corte e leite, sendo estas as principais causas de óbito nesta categoria animal (Naylor et al., 2006). As perdas econômicas incluem morte dos animais, custos com medicamentos e assistência veterinária e atraso no ganho de peso dos animais (Barrington et al., 2002).

A diarreia é uma enfermidade multifatorial resultante da interação entre agentes infecciosos (bactérias, toxinas bacterianas, vírus, protozoários, parasitas) e fatores não infecciosos relacionados à alimentação e ao meio ambiente, como: condições de higiene dos criatórios, densidade animal, manejo e condições sanitárias das mães (Lorenz, 2006). Esta enfermidade acomete bezerros nos primeiros dias de vida causando retardo de crescimento e mortalidade de cerca de 20% dos mesmos (Mota et al., 2000). Mundialmente, estima-se uma perda entre 20,0% (Morteo et al., 1990) e 44,4 % (Windeyer et al., 2014) dos bovinos leiteiros devido à diarreia. A morte de bezerros em decorrência da diarreia se dá, principalmente, por uma soma de fatores, com envolvimento complexo de múltiplos sistemas, tendo como etiologia primária a enfermidade digestiva, acompanhada pelos desequilíbrios hidroeletrolítico, ácido-base, endotoxemia e choque (Gonçalves et al, 2011).

Processo semelhante ocorre nos casos de broncopneumonia, em que o processo inflamatório desencadeado provoca a liberação de enzimas e substâncias tóxicas, como radicais livres que lesam tecidos adjacentes, provocando seu comprometimento ou perda da função (Gonçalves et al, 2011). Da mesma forma que a diarreia, a broncopneumonia é uma doença de causa multifatorial, que requer a combinação ativa de um ou mais agentes infecciosos e do meio ambiente com o hospedeiro para que possa se desenvolver (Snowder et al., 2006). Pode ser causada por bactérias, vírus, fungos, parasitas, clamídias, micoplasmas e, em determinadas condições, por substâncias químicas irritantes e agentes físicos (Snowder et al, 2006). As perdas econômicas decorrentes das doenças respiratórias se dão de forma cumulativa, pelos custos com tratamento, redução da produção e perdas por mortes (Bellinazzi, 2013).

Um fator determinante na taxa de cura destas enfermidades é o diagnóstico precoce, visto que alterações infecciosas em neonatos ocorrem de forma

extremamente aguda (Uetake et al., 2013). De forma geral o seu diagnóstico é baseado em sintomatologia clínica e isolamento do agente infeccioso envolvido (Gonçalves, et al., 2001). Porém, outros métodos de diagnóstico, os quais monitoram a ocorrência de doença de forma precoce podem ser utilizados, como forma de aumentar a chance de resposta ao tratamento utilizado. Entre os parâmetros possíveis de monitoramento de processos mórbidos, as proteínas de fase aguda (PFA) vêm sendo estudadas em várias espécies, relacionadas ao diagnóstico das mais diversas doenças (Petersen et al., 2004). Pesquisas realizadas nas últimas décadas mostram que a quantificação de PFA, no plasma ou no soro sanguíneo, pode ser útil tanto no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças quanto no bem estar de indivíduos ou de rebanhos (Murata et al., 2004; Gonzáles et al., 2007; Jain et al., 2011; Cray, 2012).

A resposta de fase aguda é uma reação do organismo em resposta a distúrbios hemostáticos causados por infecção, dano tecidual, crescimento neoplásico e desordens imunológicas (Petersen et al., 2004). Durante o desenvolvimento da resposta de fase aguda a uma infecção, são liberados citocinas e outros mediadores da resposta imune que desencadeiam, entre outros efeitos, a variação das concentrações de algumas proteínas presentes no plasma, entre as quais podem ser citadas a haptoglobina e a paroxanase(PON 1)(Krause et al., 2014). Na medicina humana, e cada vez mais na medicina veterinária, o monitoramento das concentrações plasmáticas destas proteínas proporciona uma valiosa informação em diversos problemas patológicos que cursam com inflamação, podendo ser utilizada não só para o diagnóstico, como também para monitorar a evolução da enfermidade e avaliar a resposta aos tratamentos preconizados (Skinner et al, 2001). Os níveis fisiológicos de haptoglobina em neonatos bovinos se encontram menores que 0,81 g/L (Idoate et al, 2015), já os níveis fisiológicos de paraoxonase ainda não foram estabelecidos, bem como suas variações em bezerros com diarreia e broncopneumonia, visto que seus níveis podem ser influenciados pela idade (Orro et al., 2008) e respondem de forma diferenciada de acordo com a evolução da doença (Hultén et al., 2003).

Skinner et al (2001), sugeriu que ensaios para a quantificação de PFA seriam utilizados rotineiramente no futuro, a fim de avaliar a saúde animal, otimizar o desempenho produtivo individual, monitorar a eficácia de terapias antibióticas,

detectar doenças e, ainda, propiciar benefícios consideráveis à segurança alimentar, por meio da avaliação dos animais antes do abate. A monitoração da resposta inflamatória pode ser um desafio clínico, pois nem sempre os sinais de inflamação se manifestam de modo evidente. Ganheim et al, 2003, em estudo com bovinos experimentalmente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina e por *Mannheimia haemolytica*, relataram que em vários momentos os sinais clínicos foram muito sutis e que, portanto, a doença inflamatória/infecciosa passaria despercebida se não fossem mensuradas as PFA, as quais se mostraram significativamente alteradas.

Também, o conhecimento das alterações que ocorrem no perfil bioquímico sérico de bezerros neonatos é uma importante ferramenta de diagnóstico em situações de morbidez, permitindo o monitoramento da função de vários sistemas orgânicos (Russell & Roussel, 2007). A determinação do perfil energético e proteico permite mensurar as alterações em quadros onde há perda de nutrientes, como na diarreia, ou mesmo em doenças que cursam com inapetência, como no caso da broncopneumonia. Ainda, a mensuração de perdas eletrolíticas em neonatos é de grande valia para o estabelecimento da terapia e determinação do prognóstico em neonatos (Freitas et al., 2010). Ainda, o estudo da expressão gênica em animais pode fornecer evidências dos elementos envolvidos tanto no surgimento quanto na progressão e definição da existência ou grau de severidade de doenças (Schneider et al., 2010). A avaliação da expressão de genes ligados ao metabolismo e resposta imune pode trazer informações sobre o potencial de desenvolvimento de doenças e desempenho zootécnico (Lohakare et al., 2012), sendo que muitos dos efeitos destes fatores sobre o desempenho podem ser gerados ainda no período pré-natal, relacionado principalmente com a dieta materna (Osorio et al., 2013). Como sequela destas enfermidades e de tratamentos mal conduzidos em relação às condições clínico-metabólicas do indivíduo, muitos animais acabam tendo seu desenvolvimento corporal retardado. Em ratos, o processo séptico é capaz de desenvolver resistência hepática ao hormônio do crescimento (GH), fazendo com que os níveis circulantes de IGF-I sejam diminuídos (Yumet et al., 2006), o que conseqüentemente pode trazer prejuízo ao desenvolvimento corporal (Graham et al., 2010).

Em bezerros, o tratamento de eleição para manutenção da volemia em quadros de diarreia é a infusão intravenosa contínua de solução isotônica com eletrólitos ou metabólitos energéticos. No entanto, esta abordagem terapêutica é trabalhosa e dispendiosa. Diante disso, a reidratação oral surge como uma opção viável e eficaz (Constable et al., 1996). O uso do antibiótico do grupo das quinolonas – enrofloxacino de ação rápida – foram lançadas recentemente. Estes medicamentos atingem rapidamente as concentrações terapêuticas no plasma em 30 e 60 minutos. O pico plasmático ocorre entre 5 e 6 h, proporcionando resposta terapêutica com dose única (Mendes et al., 2012).

2.0 Objetivo Geral

Determinar marcadores preditivos de diarreia e broncopneumonia em neonatos bovinos, bem como avaliar eficiência de protocolos terapêuticos para diarreia.

2.1 Objetivos Específicos

1. Determinar os níveis de marcadores metabólicos de bezerras previamente ao acometimento destas por diarreia ou broncopneumonia;
2. Determinar os níveis de proteínas de fase aguda de bezerras previamente ao acometimento destas por diarreia ou broncopneumonia;
3. Avaliar padrão de expressão gênica no primeiro dia de vida de bezerras, de genes ligados ao desenvolvimento corporal e resposta inflamatória em bezerras posteriormente acometidas de diarreia ou broncopneumonia durante a fase neonatal;
4. Determinar a variação nos níveis de parâmetros metabólicos e proteínas de fase aguda em neonatos bovinos submetidos a diferentes tratamentos para diarreia;
5. Relacionar a ocorrência de doenças (diarreia e broncopneumonia) e níveis de parâmetros metabólicos e proteínas de fase aguda com o desenvolvimento corporal de neonatos bovinos.

3. Projeto de pesquisa

Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Departamento de Zootecnia

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

**Marcadores metabólicos e de resposta imune para diagnóstico e avaliação
clínica de neonatos bovinos acometidos de diarreia e broncopneumonia**

Ismael Mateus Cavazini – Orientado

Francisco Augusto Burkert Del Pino - Orientador

EQUIPE:

Proponente/Coordenador do Projeto:

Viviane Rohrig Rabassa

Faculdade de Veterinária - UFPel

NUPEEC – Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
(www.ufpel.edu.br/nupeec)

Pesquisadores colaboradores:

Augusto Schneider

Cássio CassalBrauner

Eduardo Schmitt

Elizabeth Schwegler

Francisco Augusto Burkert Del Pino

Marcio Nunes Corrêa

Raquel Fraga e Silva Raimondo

Rubens Alves Pereira

Programa Proponente:

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia –UFPEl

Programa de Pós-Graduação em Veterinária - UFPEl

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPEl

Pelotas, 2016.

3.1 Caracterização do Problema

Durante as primeiras semanas de vida, distúrbios do trato digestivo e respiratório apresentam alta incidência em neonatologia bovina (SNOWDER et al., 2006; BOTTEON et al., 2008). Distúrbios como a diarreia e broncopneumonia representam importantes prejuízos econômicos para a bovinocultura, sendo estas as principais causas de óbito em bezerros (OLIVEIRA et al., 2012). As perdas econômicas incluem custos com medicamentos e assistência veterinária, atraso no ganho de peso, retardando o início da vida produtiva destes animais, e óbitos (BARRINGTON et al., 2002).

A diarreia e broncopneumonia são enfermidades multifatoriais resultantes da interação entre agentes infecciosos e fatores não-infecciosos relacionados à alimentação, condições de higiene dos criatórios, densidade populacional, manejo, condições sanitárias das mães, entre outros (BARRINGTON et al., 2002; CALLAN & GARRY, 2002). Estas enfermidades podem acometer animais desde os primeiros dias de vida, causando importantes perdas econômicas, principalmente por retardo de crescimento e mortalidade, a qual pode chegar a 25% (ANDREWS & READ, 1983; UETAKE, 2013).

Apesar da alta relevância destas doenças e da constante busca por novas alternativas terapêuticas antimicrobianas (MOTA et al., 2000; DAVIS et al., 2007; CONSTABLE, 2009), não se observam reflexos consistentes na redução da taxa de mortalidade de bezerros neonatos nos últimos anos. Sabe-se que a morte de bezerros por estas enfermidades se dá por uma soma de fatores, com envolvimento complexo de múltiplos sistemas, tendo como etiologia primária a enfermidade digestiva ou respiratória, e agravada pelos desequilíbrios hidro-eletrolítico e ácido-base, endotoxemia e choque (FOSTER & SMITH, 2009; FREITAS et al., 2010).

Estas alterações se devem a dificuldade do neonato em manter a temperatura corporal nos primeiros dias de vida, à rápida perda de líquidos e eletrólitos, bem como à alta dependência da ingestão de colostro para manutenção do seu estado nutricional e obtenção da imunidade passiva, fazendo com que sejam altamente dependentes de fatores ambientais e nutricionais para

manutenção de sua homeostasia (BLUM, 2006). Porém, estes desequilíbrios clínico-metabólicos muitas vezes não são mensurados e, conseqüentemente, negligenciados no tratamento de doenças infecciosas, os quais focam somente no uso de antibióticos e anti-inflamatórios, sem correção dos distúrbios hidro-eletrolíticos e ácido-base, o que acaba comprometendo a vida do animal.

Assim, a determinação de parâmetros metabólicos torna-se importante para avaliação da necessidade de reposição hidro-eletrolítica e energética em enfermidades neonatais, permitindo que o tratamento suporte seja baseado nas reais necessidades do indivíduo (NAYLOR et al., 2006; KOCH & KASKE, 2008). Como marcadores metabólicos podem ser citados vários metabólitos, a serem escolhidos de acordo com o perfil metabólico de interesse (energético, proteico, mineral, hepático, renal, etc) (GONZÁLEZ et al., 2006; CORRÊA et al., 2010). Porém, a escassez de parâmetros fisiológicos para as diferentes faixas etárias e níveis nutricionais de bovinos, limita o uso clínico de parâmetros metabólicos para o monitoramento de enfermidades, sendo necessários estudos que aprofundem os conhecimentos já existentes sobre o metabolismo neonatal bovino.

Outro fator determinante na taxa de cura destas enfermidades é o diagnóstico precoce, visto que alterações infecciosas em neonatos ocorrem de forma extremamente aguda (UETAKE et al., 2013). De forma geral o seu diagnóstico é baseado em sintomatologia clínica e isolamento do agente infeccioso envolvido (GONÇALVES, et al., 2001). Porém, outros métodos de diagnóstico, os quais monitoram a ocorrência de doença de forma precoce podem ser utilizados, como forma de aumentar a chance de resposta ao tratamento utilizado. Entre os parâmetros possíveis de monitoramento de processos mórbidos, as proteínas de fase aguda vêm sendo estudadas em várias espécies, relacionadas ao diagnóstico das mais diversas doenças (PETERSEN et al., 2004).

A resposta de fase aguda é uma reação do organismo em resposta a distúrbios hemostáticos causados por infecção, dano tecidual, crescimento neoplásico e desordens imunológicas (KUSHNER et al., 1981; PETERSEN et al., 2004). Durante o desenvolvimento da resposta de fase aguda a uma infecção, são liberados citocinas e outros mediadores da resposta imune que desencadeiam, entre outros efeitos, a variação das concentrações de algumas proteínas presentes

no plasma, denominadas proteínas de fase aguda (APP), entre as quais podem ser citadas a haptoglobina, paroxanase e o fibrinogênio (GIORDANO et al., 2013).

Na medicina humana, e cada vez mais na medicina veterinária, o monitoramento das concentrações plasmáticas destas proteínas proporciona uma valiosa informação em diversos problemas patológicos que cursam com inflamação, podendo ser utilizada não só para o diagnóstico, como também para monitorar a evolução da enfermidade e avaliar a resposta aos tratamentos preconizados (SKINNER, 2001). Porém, seus níveis fisiológicos ainda precisam ser determinados em neonatos bovinos, bem como suas variações em bezerras com diarreia e broncopneumonia, visto que seus níveis podem ser influenciados pela idade (ORRO et al., 2008) e respondem de forma diferenciada de acordo com a evolução da doença (HULTÉN et al., 2003). Como sequela destas enfermidades e de tratamentos mal conduzidos em relação às condições clínico-metabólicas do indivíduo, muitos animais acabam tendo seu desenvolvimento corporal retardado. Em ratos, o processo séptico é capaz de desenvolver resistência hepática ao hormônio do crescimento (GH), fazendo com que os níveis circulantes de IGF-I sejam diminuídos (YUMET et al., 2006), o que conseqüentemente pode trazer prejuízo ao desenvolvimento corporal (GRAHAM et al., 2010).

Mediadores da resposta inflamatória, assim como os supressores das citocinas sinalizadoras (SOCS) e inibidores de citocinas, têm sido determinados como mediadores da resistência hepática ao GH (YUMET et al., 2006). Ainda, a SOCS-3 age como regulador negativo da regeneração hepática (RIEHLE et al., 2006), prejudicando o restabelecimento hepático após transtornos. Porém, o efeito destes mediadores inflamatórios sobre o metabolismo hepático e desenvolvimento corporal ainda não foram determinados em neonatos bovinos, necessitando de estudos nesta área, baseado nos conhecimentos existentes em outras espécies.

Assim, a hipótese deste estudo é que bezerras acometidas de diarreia e/ou broncopneumonia apresentam alteração em parâmetros metabólicos e de resposta imune (proteínas de fase aguda) precocemente em relação ao início da enfermidade, de forma que possam ser utilizados no diagnóstico destas doenças e como marcadores indicativos da resposta ao tratamento antimicrobiano e/ou de suporte utilizado. Com isto, o tratamento precoce destas enfermidades permitirá a

obtenção de uma rápida reversão do quadro clínico das infecções e, evitando assim, transtornos metabólicos, retardo no crescimento e óbitos.

Objetivo geral

Determinar a resposta metabólica e imune de neonatos bovinos a infecções entéricas e respiratórias, bem como determinar possíveis marcadores para diagnóstico precoce e monitoramento da evolução clínica destas alterações.

Objetivos específicos

1. Determinar um padrão clínico de bezerras acometidas de diarreia e broncopneumonia;
2. Determinar o perfil hematológico de bezerras acometidas de diarreia e broncopneumonia;
3. Determinar o perfil bioquímico (minerais, proteínas totais, proteínas de fase aguda e enzimas hepáticas) de bezerras acometidas de diarreia e broncopneumonia;
4. Identificar possíveis marcadores bioquímicos no auxílio ao diagnóstico precoce e monitoramento da resposta clínica em casos de diarreia e broncopneumonia;
5. Avaliar a resposta clínica de bezerras submetidas a tratamento para diarreia e broncopneumonia com ou sem associação de tratamento suporte;
6. Avaliar o desenvolvimento corporal de bezerras que passaram por quadros clínicos de diarreia e/ou broncopneumonia;
7. Determinar a expressão de genes ligados ao desenvolvimento corporal e metabolismo hepático em fêmeas acometidas de diarreia e/ou broncopneumonia durante a fase neonatal.

Metas

Validar marcadores de diagnóstico precoce e monitoramento da evolução clínica de diarreia e broncopneumonia neonatal bovina através da mensuração de parâmetros metabólicos e de resposta imune.

Indicadores

- Produção de uma dissertação;
- Produção de pelo menos um artigo em revista de circulação internacional e um artigo em revista de circulação nacional;
- Publicar resumos em congressos nacionais e internacionais da área.

4. Metodologia a ser empregada:

Instalações

O experimento será realizado em uma propriedade leiteira ao sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' E.

Os animais serão mantidos em sistema semi-intensivo de produção sob mesmas condições de manejo e alocados em sistema de estacas. Diariamente serão levantados dados do ambiente ao qual eles serão submetidos, quanto à temperatura ambiental, umidade do ar e nível pluviométrico.

Animais

Serão monitoradas 200 bezerras da raça Holandês, com um dia de vida. Após o nascimento os animais serão separados da mãe e receberão colostro, de acordo com o manejo da fazenda. As bezerras serão alojadas em abrigos individuais, e passarão a receber quatro litros de leite dia, divididos em duas refeições (7 e 17h), e terão livre acesso à água e ao concentrado inicial peletizado (Supra Terneira Laminado, Supra[®], São Leopoldo, Brasil).

Grupos experimentais

Os animais serão acompanhados desde o nascimento até a 10^a semana de vida. Neste período, os mesmos serão avaliados diariamente até a apresentação de doença.

Ao apresentarem os sinais clínicos compatíveis com quadros de diarreia ou broncopneumonia as bezerras receberão o tratamento, compondo 7 grupos de 15 animais cada, sendo eles: grupo Antibiótico BRONCO, grupo Antibiótico + Suporte BRONCO, grupo Suporte BRONCO, grupo Antibiótico DIARREIA, grupo Antibiótico

+ Suporte DIARREIA, grupo Suporte DIARREIA e grupo Controle. Os grupos serão submetidos aos tratamentos até a reversão do quadro clínico. O antibiótico utilizado nos grupos que o recebem será a enrofloxacin de rápida ação (Kinetomax®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose de 7,5 mg/kg de peso vivo (PV), por via intramuscular. O tratamento suporte para os quadros de diarreia será administração oral de carvão vegetal ativado (6 gramas), uma vez a dia durante 3 dias, fluidoterapia endovenosa a base de glicose 5% e ringer lactato, enquanto o animal demonstrar sinais de desidratação, e administração intramuscular de flunixinmeoglumine (Flunamine®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose de 1,1 mg/kg de PV, por via intramuscular. Para os casos de broncopneumonia o tratamento suporte será composto de administração de mucolítico (cloridrato de bromexina, Aliv V, Agener União, Brasil) em dose de 0,3 mg/kg de PV, fluidoterapia endovenosa e flunixinmeoglumine, nos mesmos moldes dos animais com diarreia.

Avaliações zootécnicas

Os animais serão pesados ao nascer e semanalmente, em balança mecânica, sempre antes do fornecimento da dieta no período da manhã, até a 10ª semana de vida. Semanalmente serão feitas medidas de altura na cernelha e largura na garupa com o auxílio de régua graduada em centímetros, e perímetro torácico com fita flexível, também graduada em centímetros. O desenvolvimento dos animais será acompanhado mensalmente em sua fase de crescimento, até 12 meses de idade, em relação às medidas corporais e peso. Aos 12 meses de idade as bezerras serão avaliadas, com o método padronizado por Huerta-Leidenz (1993), segundo o grau de adiposidade com auxílio de ultrassom (Aloka SSD-500, Campinas, Brasil).

Avaliações Clínicas

Os animais serão observados diariamente até a 10ª semana de vida e, assim que qualquer alteração no comportamento, condição física e desempenho forem percebidos, será realizado exame clínico minucioso, em busca de sinais indicativos de comprometimento do trato digestório e respiratório. Serão determinados os sinais clínicos, compreendendo frequência cardíaca, frequência

respiratória, temperatura corporal, coloração de mucosas e o grau de desidratação, através dos parâmetros propostos por Raiser (2003).

Durante o exame clínico específico do sistema digestório, uma amostra de fezes será coletada mediante estimulação da ampola retal, sendo observadas as características quanto a consistência (fluidez), coloração, odor, quantidade, e presença de substâncias anormais. Dos animais com defecação voluntária, será observada presença de disquezia. Serão caracterizadas como diarreicas as fezes de consistência mole a líquida. O monitoramento do escore fecal será realizado através de observações visuais diárias (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação do Escore de Fezes de acordo com a fluidez.

Escore de Fezes	Fluidez
1	Normal
2	Mole
3	Corrente
4	Aquosa
5	Líquida

Fonte: Adaptado de Larson (1977).

Na avaliação clínica específica do aparelho respiratório, serão monitoradas temperatura corporal, reflexo de tosse, secreção nasal, secreção ocular e postura da orelha, e então classificados quanto ao grau de severidade da doença, segundo McGuirk(2009), como também auscultação da área de projeção pulmonar no tórax para determinação da presença de crepitação.

Coleta e processamento das amostras

Amostras de 15 mL de sangue serão coletadas duas vezes por semana de todos os animais desde o nascimento até o aparecimento de sinais clínicos ou até a 10ª semana de vida, em caso de animais que não apresentarem diarreia ou broncopneumonia. Nos animais doentes, serão colhidas amostras a cada 48h a

partir da apresentação do sinal clínico até a reversão do quadro. A metodologia utilizada será a venopunção jugular, após assepsia local com álcool iodado, utilizando-se tubos vacuolizados contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo coletados 5 mL de sangue para a realização do hemograma. Os mesmos procedimentos serão empregados para a coleta de amostras de 10 mL de sangue em tubos sem anticoagulantes, para as análises bioquímicas e imunológicas do soro sanguíneo. As amostras de sangue venoso que serão coletadas com anticoagulante EDTA serão aferidas em relação à contagem de hemácias e de leucócitos totais e ao teor de hemoglobina, em aparelho semi-automático. O volume globular será obtido em microtubos de 50 µL submetidos à centrifugação a 13.000 x g, durante 5 minutos. O cálculo dos índices hematimétricos será realizado utilizando-se as fórmulas matemáticas destinadas a tal fim (THRALL, 2007). A contagem diferencial de leucócitos será realizada em esfregaço sanguíneo corado com corante de Rosenfeld modificado, após contagem de 100 células, em microscopia óptica (THRALL, 2007).

A partir das amostras de sangue sem anticoagulante serão feitos ensaios bioquímicos e imunológicos. Para determinar os teores séricos de proteína total, albumina, ureia, creatinina, glicose, colesterol, cálcio, fósforo, potássio, cloretos, sódio, bicarbonato e magnésio, bem como as atividades das enzimas gamaglutamiltransferase (GGT) e aspartatoaminotransferase (AST), utilizando-se conjuntos de reagentes de uso comercial (Labtest, Belo Horizonte, Brasil). A leitura das amostras será realizada em espectrofotômetro de luz visível (BioEspectro® SP 220, Bioespectro, Curitiba, Brasil), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste. Com o intuito de analisar as concentrações séricas de paraoxanase, será realizado o método cinético, através da quantidade de fenol formada pela clivagem de fenil acetato, catalisado pela paraoxanase, através de kit comercial (Arylesterase/paraoxonase assay kit, Zeptometrix Corporation, Buffalo, NY). A haptoglobina será mensurada através do método colorimétrico, pela reação de peróxido de hidrogênio com a hemoglobina que oxida o guaiacol liberando luz, segundo protocolo de Connell&Smithies (1959). O fibrinogênio será analisado através de refratometria.

Amostras de soro sanguíneo também serão utilizadas para detecção de anticorpos, através das técnicas de soroneutralização e Reação da Cadeia

Polimerase (PCR), contra doenças virais com os mesmos sinais clínicos das enfermidades abordadas, sendo elas: Diarreia Viral Bovina (BVD), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI3), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), Coronavírus bovino e Rotavírus bovino.

Exames coproparasitológicos serão realizados no dia em que será identificada a doença e 72h após, pelo Laboratório Regional de Diagnósticos e Laboratório de Parasitologia – UFPel, com o intuito de isolamento do agente e como diagnóstico diferencial de endoparasitoses intestinais e pneumonias verminóticas. Será realizado lavado traqueobrônquico no dia em que for diagnosticada clinicamente a broncopneumonia e, novamente, 72h após. A técnica para a realização da lavagem traqueobrônquica será por traqueocentese, como descrito por Gonçalves et al. (1990). A partir dos lavados traqueobrônquicos obtidos, será feito isolamento e antibiograma, no Laboratório Regional de Diagnósticos – UFPel, e determinado as proporções celulares de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e células epiteliais. No primeiro dia de vida e aos 12 meses de idade serão realizadas biópsias hepáticas nas bezerras. As biópsias hepáticas transcutâneas serão realizadas no 11º espaço intercostal com uma agulha apropriada de 20 cm de comprimento, após a tricotomia e anestesia local com 7 mL de lidocaína a 2% na região da incisão (RADCLIFF et al., 2003). Após a biópsia será aplicada uma dose de flunixin meglumine (Flunamine®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose de 1,1 mg/kg, por via intramuscular, e curativodiário da ferida cirúrgica com iodopovidine durante 3 dias.

As amostras de tecido hepático serão congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. A extração do RNA das células hepáticas será feita usando o protocolo do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A purificação das amostras será feita com o kit Qiagen RNeasy mini (RNeasy Mini Kit, Qyagen, Valencia, CA, USA). A quantificação do RNA será feita em espectrofotômetro a 260 e 280 nm. A integridade do RNA extraído será verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. Serão usadas somente amostras que apresentem as bandas 18S e 28S íntegras. Então será realizada a síntese do cDNA (SuperScript III FirstStrandSynthesisSuper Mix, Invitrogen, Carlsbad, EUA), correspondente ao conteúdo de RNAm obtido na extração. Após será realizada uma PCR em tempo real (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad, EUA) com os *primers* específicos para

determinação do nível de mRNA para GHR, IGF1, leptina, SOCS3 e enzimas gliconeogênicas (fosfoenol piruvato carboxiquinase citossólica e mitocondrial e piruvatocarboxilase), sendo utilizada a RPS9 e GAPDH como controles endógenos.

Será realizada avaliação bromatológica e microbiológica do colostro e leite fornecido às bezerras, a cada duas semanas durante o experimento. Serão feitas análises referentes ao teor de gordura, determinação do extrato seco desengordurado e teor de proteína. As amostras serão submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp., determinação do número mais provável (NMP) de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C, contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e contagem total de bactérias aeróbias psicrótróficas, segundo metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003).

Análise Estatística

Os dados obtidos deste experimento serão analisados no programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA). As médias serão analisadas através do método MIXED MODELS, considerando o animal, o grupo e o e momento da coleta. A comparação de médias individuais será feita através do teste de Tukey-Kramer. Médias pontuais serão analisadas através do método One-way ANOVA. A correlação entre as variáveis será feita através do coeficiente de correlação de Pearson. Serão considerados significativos valores de $P < 0,05$.

5. Principais contribuições científicas, tecnológicas ou de inovação da proposta:

- Científica (Fronteira do conhecimento):

Aumentar o conhecimento sobre a resposta metabólica e imune de neonatos bovinos a infecções entéricas e respiratórias, bem como determinar possíveis marcadores para diagnóstico precoce e avaliação da evolução clínica destas alterações.

- Tecnológica:

Determinar um protocolo de diagnóstico e terapêutico eficaz em quadros de diarreia e broncopneumonia, de forma a diminuir os prejuízos na performance

produtiva de animais acometidos, decorrentes das sequelas destas alterações. Ainda, o conhecimento das alterações metabólicas desencadeadas por estas enfermidades permitirá que sejam desenvolvidos novos fármacos, mais adaptados às necessidades de reposição hidro-eletrolítica e energética de neonatos bovinos.

7. Cronograma físico:

Tabela 1. Cronograma físico das atividades desenvolvidas durante o projeto ao longo de 24 meses.

Atividade	Semestre			
	1º	2º	3º	4º
Revisão bibliográfica	X	X	x	X
Seleção dos animais		X		
Avaliação clínica		X		
Medidas zootécnicas		X	x	X
Coletas de sangue		X		
Análises bioquímicas		X	x	
Biópsias hepáticas		X		X
Análise de RNAm			x	X
Análise estatística		X	x	X
Preparação de artigos			x	X
Submissão de artigos				X
Reuniões semanais	X	X	x	X

12.Referências bibliográficas:

ANDREWS, A.H., READ, D.J. A comparison of disease in calves. I. A method of disease recording and its use under different system of feeding. II. Effect of different management and feeding system on one farm. **British Veterinary Journal.**, v.139, p.423-439, 1983.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 7-34, 2002.

BLUM, J.W. Nutritional physiology of neonatal calves. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, p. 1–11, 2006.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de agosto de 2003. Seção 1.

CALLAN,R.J.; GARRY, F.B.
Biosecurityandbovinerespiratorydisease.**TheVeterinaryClinicsof North America. Food Animal Practice**, v. 18, p. 57-77, 2002.

CONNELL, G. F.; SMITHIES, O. Human Haptoglobins: Estimation and Purification. **Biochemical Journal**. V. 72, p. 115-121, 1959.

CONSTABLE, P.D. Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments.**The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 25, p. 101-120, 2009.

CORRÊA, M.N.; GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Transtornos Metabólicos nos Animais Domésticos**. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 2010. 520 p.

DAVIS, J.L.; FOSTER, D.M.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p. 564-571, 2007.

FOSTER, D.M.; SMITH, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 25, p.13-36, 2009.

FREITAS, M.D.; FERREIRA, M.G.; FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.U.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; FACURY FILHO, E.J. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2608-2615, 2010.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; ALMEIDA, C.T. Lavagem traqueobrônquica por traqueocentese em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**. v.2, p.17-25, 1990.

GONÇALVES, R.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; CURI, P.R.; CHIACCHIO, S.B.; ALMEIDA, C.T.; BORGES, A.S. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Ciência Rural**, v.31, p.263-269, 2001.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GRAHAM, T.W.; BREHER, J.E.; FARVER, T.B.; CULLOR, J.S.; KEHRLI, M.E. JR.; OBERBAUER, A.M. Biological markers of neonatal calf performance: the relationship of insulin-like growth factor-I, zinc, and copper to poor neonatal growth. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2585-2593, 2010.

HUERTA-LEIDENZ, N.O.; CROSS, H.R.; SAVELL, J.W.; LUNT, D.K.; BAKER, J.F.; PELTON, L.S.; SMITH, S.B. Comparison of the fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue from mature Brahman and Hereford cows. **Journal of animal science**, v. 71, p. 625-30, 1993.

HULTÉN, C.; JOHANSSON, E.; FOSSUM, C.; WALLGREN, P. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobins markers of treatment efficacy in pigsexperimentally infected with *Actinobacilluspleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 75–89, 2003.

KOCH, A.; KASKE, M. Clinical Efficacy of Intravenous Hypertonic Saline Solution orHypertonic Bicarbonate Solution in the Treatment of InappetentCalves with Neonatal Diarrhea. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 202-211, 2008.

KUSHNER I., GEWURZ H., BENSON M. D. C-reactive protein and the acute phase response. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 97: 739-749, 1981.

LARSON, L.L.; OWEN,F.G.; ABRIGHT, J.L.; APPLEMAN, R.D.;LAMB,R.C.; MULLER, L.D. Guidelines towards more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, v. 60. p. 989–991, 1977.

MCGUIRK, S. M. University of Wisconsin - Madison. **School of Veterinary Medicine**. 2009.<http://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/8calf/calf_respiratory_scoring_chart.pdf> Data de acesso: 03 de jan. 2012.

MOTA R.A., SILVA K.P.C., RIBEIRO T.C.F., RAMOS G.A.B., LIMA E.T., SILVA L.B.G. &Zúñiga C.E.A. 2000. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarréias em bezerros e leitões. **HoraVeterinária, Porto Alegre**, 118:21-24, 2000.

NAYLOR, J.M., ZELLO, G.A., ABEYSEKARA, S. Advances in oral and intravenous fluid therapy of calves with gastrointestinal disease. In: **Word Buiatrics Congress**, 24., Nice, Paris. p.139-150, 2006.

ORRO, T. ; JACOBSEN, S. ; LEPAGE, J. ; NIEWOLD, T. ; ALASUUTARI, S. ; SOVERI, T. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteinsin newborn dairy calves. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 182-187, 2008.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurementsin veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

RADCLIFF, R.P., MCCORMACK, B.L., CROOKER, B.A., LUCY, M.C. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3933-3940, 2003.

RAISER, A. G. Alterações no equilíbrio hidroeletrólítico. In: RAISER, A. G. **Patologia cirúrgica veterinária**. Santa Maria, cap.01, p. 01-21, 2003.

RIEHLE, K.J.; CAMPBELL, J.; FAUSTO, N. Regulation of liver regeneration by suppressors of cytokine signaling-3. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 203, p. S12, 2006.

SKINNER, J. G. International standardization of acute phase proteins. Special Report. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 30, n. 1, p. 02-07, 2001.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica Clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

UETAKE, K. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 101-105, 2013.

YUMET, G.; SHUMATE, M.L.; BRYANT, D.P.; LANG, C.H.; COONEY, R.N. Hepatic growth hormone resistance during sepsis is associated with increased suppressors of cytokine signaling expression and impaired growth hormone signaling. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 1420-1427, 2006.

4. Relatório de trabalho de campo

4.1 Local

Este estudo foi realizado em uma propriedade leiteira no sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' E, a qual possui convênio firmado com a Universidade Federal de Pelotas para a realização de atividades de pesquisa. Em atividade há 60 anos, a propriedade compreende quatro diferentes setores produtivos, plantações de arroz e soja, rebanho de gado de corte e leite, com 197 funcionários fixos. A região é de clima subtropical ou temperado, com temperatura média no verão de 28°C e no inverno de 5°C, com precipitação média anual de 1.196mm/ano.

4.2 Animais, dieta e manejo

O estudo foi feito com bezerras da raça holandês filhas de um rebanho médio de 900 animais em lactação, mantidas em sistema semi extensivo. As bezerras permaneciam juntamente com a mãe no dia do nascimento para efetuar a mamada do colostro.

A alimentação do período de cria, o qual foi o foco do nosso estudo, era basicamente por 4 litros de leite diários, divididos em dois turnos e ração comercial peletizada *ad libitum* própria para a categoria em questão. Os animais eram criados em sistema de casinha e sistemas de estacas. No presente estudo os animais acompanhados foram bezerras que apresentaram ou não diarreia e broncopneumonia até os 42 dias de vida.

5. Artigo 1 - A ser submetido na revista *The Veterinary Journal*

DIARREIA NEONATAL BOVINA: MARCADORES PREDITIVOS E PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS

RESUMO

Durante as primeiras semanas de vida, distúrbios do trato digestivo apresentam alta incidência em neonatologia bovina, necessitando de diagnóstico e tratamento rápidos para que se obtenha uma boa resposta clínica. O objetivo deste estudo foi determinar a resposta metabólica e inflamatória de neonatos bovinos a infecções entéricas, bem como determinar a eficiência de diferentes protocolos terapêuticos e possíveis marcadores para diagnóstico precoce. Foram utilizadas 24 bezerras da raça Holandês, monitoradas do nascimento até 42 dias de vida, para avaliação zootécnica, biópsias hepáticas foram feitas ao nascimento e coletas de sangue periódicas até o diagnóstico de diarreia neonatal. Durante o estudo 6 bezerras se mantiveram saudáveis e 18 apresentaram diarreia. No período anterior ao acometimento clínico os animais foram avaliados quanto aos níveis séricos de GGT, PPT, albumina, paraoxonase e haptoglobina, de forma a determinar marcadores preditivos da ocorrência de diarreia. Ao nascimento foi avaliada a expressão hepática dos genes GHR1A, IGF1, STAT3, NFkB1 e SOD2. Após o diagnóstico de diarreia as bezerras foram submetidas a diferentes tratamentos (Sadias, Antibiótico, Antibiótico com suporte oral, Antibiótico com suporte endovenoso e somente suporte endovenoso) e avaliada a sua resposta clínica, através da análise sanguínea de paraoxonase, haptoglobina, GGT, PPT, albumina, globulina, cloretos, sódio, potássio, glicose, bicarbonato e uréia, além do cálculo do ânion gap e osmolaridade. Não houve alteração na expressão dos genes avaliados em relação a ocorrência de doenças, assim como não houve diferença quanto aos parâmetros zootécnicos. A paraoxonase se mostrou um importante

marcador preditivo de doenças neonatais, pois demonstrou-se alterada antes mesmo do surgimento dos sinais clínicos das doenças. A solução de reposição oral auxiliou na resposta à antibioticoterapia, por determinar um proteinograma condizente com uma resposta inflamatória mais efetiva, demonstrando uma manutenção dos níveis protéicos, além de apresentar um perfil eletrolítico (sódio, potássio, cloretos e bicarbonato, ânion gap e osmolaridade) semelhante a animais sadios, enquanto a fluidoterapia endovenosa melhorou a condição clínica de animais com diarreia por manter a volemia e os parâmetros protéicos semelhantes as bezerras sadias. Nosso estudo foi eficaz na determinação de paraoxanase como preditor diagnóstico para diarreia e avaliação da eficiência da solução de reposição oral em protocolos terapêuticos para diarreia neonatal bovina.

INTRODUÇÃO

A primeira semana constitui a fase mais crítica da vida da bezerra. Entorno de 50% das perdas no primeiro ano de vida ocorrem neste período, onde a saúde da mesma é fortemente influenciada por fatores como transferência de imunidade passiva e higiene ambiental (Lopes et al, 2009). Neste período os distúrbios do trato digestivo têm sido frequentemente relatados em neonatologia bovina. Os distúrbios entéricos, como a diarreia, representam prejuízos econômicos para a pecuária bovina por morte dos animais, custos com medicamentos e assistência veterinária e atraso no ganho de peso dos animais (Barrington et al., 2002).

A diarreia é uma enfermidade multifatorial resultante da interação entre agentes infecciosos (bactérias, toxinas bacterianas, vírus, protozoários, parasitas) e fatores não infecciosos relacionados à alimentação e ao meio ambiente, como: condições de higiene dos criatórios, densidade animal, manejo e condições sanitárias das mães (Lorenz, 2006). A morte de bezerros em decorrência desta enfermidade se dá, principalmente, por uma soma de fatores, com envolvimento complexo de múltiplos sistemas, tendo como etiologia primária a enfermidade digestiva, acompanhada pelos desequilíbrios hidroeletrolítico, ácido-base, endotoxemia e choque (Gonçalves et al, 2011).

Um fator determinante na taxa de cura desta enfermidades é o diagnóstico precoce, visto que alterações infecciosas em neonatos ocorrem de forma extremamente aguda (Uetake et al., 2013). De forma geral o seu diagnóstico é baseado em sintomatologia clínica e isolamento do agente infeccioso envolvido (Gonçalves, et al., 2001). Porém, outros métodos de diagnóstico, os quais monitoram a ocorrência de doença de forma precoce podem ser utilizados, como forma de aumentar a chance de resposta ao tratamento utilizado. Entre os parâmetros possíveis de monitoramento de processos mórbidos, as proteínas de fase aguda vêm sendo estudadas em várias espécies, relacionadas ao diagnóstico das mais diversas doenças (Petersen et al., 2004). A resposta de fase aguda é uma reação do organismo em resposta a distúrbios hemostáticos causados por infecção, dano tecidual, crescimento neoplásico e desordens imunológicas (Petersen et al., 2004). Durante o desenvolvimento da resposta de fase aguda a uma infecção, são liberados citocinas e outros mediadores da resposta imune que desencadeiam, entre outros efeitos, a variação das concentrações de algumas proteínas presentes no plasma, como a haptoglobina e a paraoxanase 1 (Krause et al., 2014). Porém, suas variações em bezerros com diarreia ainda precisam ser avaliadas, visto que seus níveis podem ser influenciados pela idade (Orro et al., 2008) e respondem de forma diferenciada de acordo com a evolução da doença (Hultén et al., 2003). Pesquisas realizadas nas últimas décadas mostraram que a quantificação de proteínas de fase aguda (PFAs), no plasma ou no soro sanguíneo, pode ser útil tanto no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças quanto no bem estar de indivíduos ou de rebanhos. (Murata et al., 2004; González et al., 2007; Jain et al., 2011; Cray et al, 2012).

Também, o conhecimento das alterações que ocorrem no perfil metabólico sérico de bezerros neonatos é uma importante ferramenta de diagnóstico em situações de morbidez, permitindo o monitoramento da função de vários sistemas orgânicos (Russel & Roussel, 2007). Como seqüela destas enfermidades e de tratamentos mal conduzidos em relação às condições clínico-metabólicas do indivíduo, muitos animais acabam tendo seu desenvolvimento corporal retardado (Yumet et al., 2006; Graham et al., 2010). Como principal alteração decorrente da diarreia está a desidratação, sendo

que a quantidade relativa de água em animais recém-nascidos é muito maior que em adultos. A distribuição da água total do corpo é distribuída em dois “compartimentos” o líquido intracelular (LIC) e líquido extracelular (LEC). Embora estes dois compartimentos defiram marcadamente na composição de eletrólitos, a água é livremente difusível entre eles (DiBartolla et al, 2000). A distribuição de volume relativo de água entre estes dois compartimentos é fortemente regulado por número de partículas osmoticamente ativas. No LEC é o teor de sódio (Na^+) que determina o seu volume, ao passo que o volume do LIC é determinado pela concentração de potássio (K^+). O cloreto (Cl^-) e o íon bicarbonato (HCO_3^-) são os principais ânions no LEC, suas interações são complexas e depende diretamente da concentração de sódio, conseqüentemente do volume do LEC, além das concentrações de potássio e do pH sanguíneo (Freitas et al, 2010). O equilíbrio osmótico entre o LIC e o LEC é mantido pelos eletrólitos, que são os solutos, e para manter a homeostase do organismo, é necessário que haja a neutralidade entre os meios, ou seja, deve haver uma equivalência entre cátions e anions nos meios (Freitas et al, 2010). Assim, a determinação destes parâmetros sanguíneos pode ser extremamente útil na avaliação da evolução de transtornos clínicos como a diarreia. Ainda, o estudo da expressão gênica em animais pode fornecer evidências dos elementos envolvidos tanto no surgimento quanto na progressão e definição da existência ou grau de severidade de doenças (Scheneider et al., 2010). A avaliação da expressão de genes ligados ao metabolismo e resposta inflamatória pode trazer informações sobre o potencial de desenvolvimento de doenças e desempenho zootécnico (Lohakare et al., 2012), sendo que muitos dos efeitos destes fatores sobre o desempenho podem ser gerados ainda no período pré-natal (Osorio et al., 2013).

Em bezerras, o tratamento de eleição para manutenção da volemia em quadros de diarreia é a infusão intravenosa contínua de solução isotônica com eletrólitos ou metabólitos energéticos. No entanto, esta abordagem terapêutica é trabalhosa e dispendiosa. Diante disso, a reidratação oral surge como uma opção viável e eficaz (Constable et al., 1996). O uso do antibiótico do grupo das quinolonas – enrofloxacino de ação rápida – foram lançadas recentemente. Estes medicamentos atingem

rapidamente as concentrações terapêuticas no plasma em 30 e 60 minutos. O pico plasmático ocorre entre 5 e 6 h, proporcionando resposta terapêutica com dose única (Mendes et al., 2012). Com isto, o objetivo deste estudo foi determinar marcadores preditivos de diarreia em neonatos bovinos, bem como avaliar a eficiência de protocolos terapêuticos através de marcadores metabólicos e de resposta inflamatória.

MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) aprovou todos os procedimentos realizados neste experimento (código CEEA: 2827).

Animais e Instalações

Este estudo foi realizado em uma fazenda comercial localizada no sul do Rio Grande do Sul - RS (32,8°16'S, 52,8°32'L). Foram monitoradas 70 bezerras da raça Holandês, sendo utilizadas neste estudo 24 bezerras, avaliadas desde o nascimento até a sexta semana de vida. Após o parto, os animais permaneceram aproximadamente 12 h com as vacas, a fim de receberem colostro naturalmente, de acordo com o manejo da fazenda, sendo posteriormente alojados nas instalações de cria e recria.

Os animais foram mantidos em abrigos individuais ripados de 1 m², cobertos e suspensos a 1,5 m do solo (Abrigo, n=12), ou alocados em estacas individuais, diretamente no solo e sem cobertura (Estaca, n=12). A dieta fornecida aos animais era composta de quatro litros de leite por dia, divididos em duas refeições (7 e 17 h), com acesso livre ao concentrado inicial peletizado (Supra Terneira Laminado, Supra®, Brasil) de acordo com o NRC (2001) e água *ad libitum*.

Biópsias hepáticas e análises de expressão gênica

No primeiro dia de vida foram realizadas biópsias hepáticas em todas as bezerras em virtude de conhecer como estas bezerras estavam quanto a sua condição imuno-inflamatória e se a diarreia que veio a acometer as bezerras posteriormente tiveram ligação com esta condição ou foram causadas pela questão ambiental e de manejo posterior ao nascimento. As biópsias hepáticas transcutâneas foram realizadas

no 11º espaço intercostal com uma agulha apropriada de 20 cm de comprimento, após a tricotomia e anestesia local com 7 mL de lidocaína a 2% na região da incisão (Radcliff et al., 2003). Após a biopsia foi aplicada uma dose de flunixin meglumine (Flunamine®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose de 1,1 mg/kg, por via intramuscular, e curativo da ferida cirúrgica com iodopovidine durante 3 dias. As amostras de tecido hepático foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento da análise.

O RNA total foi extraído pelo método do Trizol, tratadas com DNase e purificadas utilizando o kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e a integridade verificada através de eletroforese em gel de agarose. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o iScript™ Synthesis Kit (BIORAD, Hercules, CA, EUA) com 1 µg de RNA total em um volume final de 20 µL. As reações foram conduzidas em um termociclador (MyCycler™ ThermalCycler, BIO RAD, Hercules, Califórnia, EUA), de acordo com o seguinte protocolo: 5min à 25 °C, 30min à 42 °C e 5min à 85 °C. O produto final foi diluído para 5 ng/µL. Foi realizado o PCR em tempo real usando SYBR Green para avaliar a expressão dos genes GHR1A, IGF1, SOD2, NFKB1 E STAT3, e o UXT foi utilizado como controle endógeno. As sequências dos iniciadores (primers), posição de hibridização, e tamanho do amplicon estão listados na Tabela 1, o sequenciamento do amplicon está listado na tabela suplementar. As reações de PCR foram realizadas em duplicata com volume de 10 µL, utilizando 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,4 µL de cada iniciador (10 µM), 4 µL do cDNA e 0,2 µL de água ultrapura. As reações foram executadas no sistema ECO™ Real-Time PCR System (iLLumina®, San Diego, CA, EUA). Para cada ensaio foram corridos 40 ciclos (95 °C durante 3s e 60 °C durante 30s) e uma curva de dissociação foi incluído no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. Cada placa de ensaio incluiu um controle negativo usando água ultrapura. O coeficiente de variação foi inferior a 5% para todos os pares de iniciadores utilizados. A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra

analisada; C, o valor de Ct para o gene UXT na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene UXT na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle (animais sadios) foram ponderadas, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo de controle (foldchange) (Masternak et al., 2005).

Tabela 1. Gene ID, número de acesso ao GenBank, posição de hibridização, sequência e dos primers e tamanho dos Amplicons para *Bos taurus* usados para análise de expressão gênica.

Gene ID	Acesso #	Gene	Pos.Hib.	Primers (5'-3')	pb
280805	AC_000177.1	GHR1A	F.	TCCAGCCTCTGTTTCAGGAG	64
			R.	GCTGCCAGAGATCCATACCT	
281239	AC_000162.1	IGF1	F. 166	CCAATTCATTTCAGACTTTGCA	103
			R. 268	CACCTGCTTCAAGAAATCACAAAA	
508541	AC_000176.1	STAT3	F. 3804	GGTAGCATGTGGGATGGTCTCT	95
			R. 3913	GCATCCCTAGAAACTCTGGTCAA	
616115	AC_000163.1	NFKB1	F. 172	TTCAACCGGAGATGCCACTAC	110
			R. 266	ACACACGTAACGGAAACGAAATC	
281496	AC_000166.1	SOD2	F. 620	TGTGGGAGCATGCTTATTACCTT	95
			R. 714	TGCAGTTACATTCTCCCAGTTGA	
525680	AC_000187.1	UXT	F. 323	TGTGGCCCTTGGATATGGTT	101
			R. 423	GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG	

Tabela Suplementar. Gene e sequenciamento do produto da PCR dos primers utilizados neste experimento.

Gene	Sequenciamento dos Amplicons
------	------------------------------

IGF1 CCGGTACAGGGAATCAGCAGTCTCCACCCAATTATTTAAGTGCTGCTTTTGTGATTTCTTGAAGCAGGGGTGAAAA

STAT GCATCCCTCTACGAGCACGGCTAGATGTGGTCGGCTACAGCCATCTTGTCTCAGTTGACCAGAGTTTCTAGGGATGC
3 AA

NFKB CGATATCTTCGTGTCAAGCAAAAGTATTCGCAACACTGGAAGCACGAATGACAGATGCCTGTATACGGGGCATCAG
1 AAGGCCGTA

SOD2 GCATGTTTGGCCGATTATCTGAGGCCATTTTGAATGTGATCAACTGGGAGAATGTAAGTCAATAC

Exame Clínico

Durante o período experimental foram realizados exames clínicos duas vezes por semana em todos os animais. Além disso, foram observados e avaliados a sua condição clínica. Quando percebidas quaisquer alterações, o exame clínico foi realizado novamente, em busca de sinais indicativos de comprometimento do trato digestório, as análises foram feitas durante o período de 42 dias, porém, os animais utilizados no experimento tiveram suas coletas analisadas, foram os acometidos de diarreia a partir do dia 28 pós nascimento.

Durante o exame clínico específico do sistema digestório no dia do diagnóstico (0 h), coletou-se uma amostra de fezes para análise de consistência (fluidez). O monitoramento do escore fecal foi realizado através de observações visuais diárias, considerando-se como diarreicas as fezes de consistência mole à líquida (Larson, 1977).

Quando identificada diarreia os animais foram avaliados nos momentos 0, 24, 72 e 120 h em relação ao diagnóstico. As funções vitais avaliadas foram frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR), coloração das mucosas, temperatura corporal, tempo de perfusão capilar (TPC) e teste da prega cutânea, através dos parâmetros propostos por Raiser (2003).

Animais que apresentaram outras enfermidades durante o período de avaliação foram eliminados do estudo, restando 6 animais classificados como saudáveis (não apresentaram alterações nos parâmetros vitais durante os primeiros 42 dias de vida) e 18 animais que foram acometidos por diarreia.

Tratamentos para diarreia

As bezerras receberam o tratamento específico para a doença, compondo cinco grupos experimentais: Grupo controle, que não apresentou diarreia (SADIAS; n=6), Grupo antibiótico (ATB; n=4), Grupo antibiótico + suporte endovenoso (ATB+SE; n=4), Grupo suporte endovenoso (SE; n=3) Grupo antibiótico + suporte por via oral (ATB+SO; n=7).

O princípio ativo utilizado nos grupos que receberam antibiótico foi o enrofloxacino de rápida ação (Kinetomax®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose única de 7,5 mg/kg de peso vivo (PV), por via intramuscular (IM). O tratamento suporte utilizado nos grupos ATB+SE e SE consistiu na

administração oral de carvão vegetal ativado (6 gramas), uma vez ao dia durante 3 dias, flunixinmeoglumine (Flunamine®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose de 1,1 mg/kg de PV, por via IM, e, em casos de desidratação, fluidoterapia endovenosa (EV) à base de NaCl 0,9%, em volume a ser estabelecido de acordo com o grau de desidratação (Berchtold, 2009). Para o grupo ATB+SO foi substituída a fluidoterapia EV pela suplementação com solução de reposição oral (Glutellac®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), na dose de 50 mL, adicionada ao leite, nos dois aleitamentos diários. As doses utilizadas de enrofloxacin, flunixinmeoglumine e carvão ativado foram as mesmas utilizadas nos grupos ATB+SE e SE.

Coleta e processamento das amostras sanguíneas

Amostras de 10mL de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante uma vez por semana de todos os animais desde o nascimento até o aparecimento de sinais clínicos de diarreia e/ou até a sexta semana de vida, em caso de animais que não apresentarem diarreia. Também foram coletadas amostras de sangue nos momentos 0, 24, 72 e 120 horas em relação ao diagnóstico de diarreia, utilizando-se tubos vacuolizados para a coleta de amostras de 10 mL de sangue em tubos sem anticoagulantes. Após a coleta, o sangue foi submetido à centrifugação a 1800xg para obtenção de amostras de soro, as quais foram identificadas e congeladas a -70 °C.

Para avaliação do perfil metabólico anterior ao acometimento clínico foram utilizadas as coletas dos dias -28, -21, -14 e -7 em relação ao dia do diagnóstico de diarreia. Foram determinados os níveis séricos de proteínas plasmáticas totais (PPT), gama glutariltransferase(GGT), albumina, paraoxanase 1 (PON1) e haptoglobina durante o período pré acometimento para diarreia afim de determinar o perfil metabólico e preditores diagnósticos das bezerras e verificar a relação dos resultados com o acometimento clínico. Durante o período de diarreia, também foi feita a mensuração de bicarbonato, globulinas, ureia, cloretos, sódio, potássio e glicose, além do cálculo do Ânion Gap e Osmolaridade afim de determinar quais os tratamentos tiveram melhor eficácia em controlar os sinais clínicos dos animais. Para análise de PPT, GGT, albumina, glicose, sódio, potássio, cloretos e ureiafoi utilizado conjuntos de reagentes de uso comercial da marca Labtest(Labtest, Belo Horizonte, Brasil), para análise de bicarbonato foi utilizado kit comercial da marca Diasys(Diasys,

São Paulo, Brasil). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de luz visível (BioEspectro® SP 220, Bioespectro, Curitiba, Brasil), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste. Para determinação da atividade PON1 no meio de MIV foi utilizado um protocolo previamente descrito (Browne et al., 2007). Brevemente, foi utilizado um tampão Tris/HCl 20 mM, contendo 1 mM de cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:3) em Tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 µL da amostra diluída em 500 µL da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: Δ Absorbância x 115 x 3. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL. A haptoglobina foi mensurada através do método colorimétrico, pela reação de peróxido de hidrogênio com a hemoglobina que oxida o guaiacol liberando luz, segundo protocolo de Connell&Smithies (1959). O ânion gap foi determinado através da fórmula (concentração sérica de sódio + concentração sérica de potássio) – (concentração sérica de cloretos + concentração sérica de bicarbonato) (LEAL et al., 2012). A osmolaridade foi determinada através da metodologia descrita por Rocha (2011). Em todas as análises o coeficiente de variação foi inferior a 10%.

Avaliações zootécnicas

Semanalmente (desde o nascimento até 42 dias de vida), foram realizadas mensurações de altura da cernelha, largura da garupa, perímetro torácico. Nos mesmos dias, os animais eram pesados (para avaliação do ganho médio diário (GMD) com uso de fita de pesagem indicada para bovinos, sempre antes do fornecimento da dieta matutina (Reis, et al., 2008).

Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA). As variáveis foram analisadas através do método MIXED MODELS, considerando o grupo, o momento e suas interações como efeitos fixos, e os animais dentro do grupo como efeito aleatório. Variáveis que não apresentaram distribuição normal dos resíduos foram transformadas para log. P. Para os parâmetros zootécnicos foi considerado o sistema de criação, os grupos e suas interações. A comparação de médias foi feita através do teste de Tukey-Kramer.

RESULTADOS

Durante o período de avaliação 6 bezerras se mantiveram saudáveis e 18 apresentaram diarreia, sendo que, quanto aos resultados das análises metabólicas no período pré diarreia, não constatou-se diferença entre os animais que apresentaram ou não a doença para albumina e PPT (tabela2). Já a concentração de PON1 (figura1) foi menor ($P < 0,0001$), nos animais que apresentaram a doença, assim como a haptoglobina, (figura1; $P = 0,04$). Quanto aos níveis de GGT (figura1), os animais que se mantiveram sadios apresentaram menor valor ($P = 0,0009$).

Tabela 2. Médias e erro médio padrão de parâmetros metabólicos de bezerras avaliados anteriormente ao acometimento clínico de diarreia.

Parâmetros	Grupos		Significância (valor de P)		
	Sadias	Diarreia	Grupo	Momento	Grupo* Momento
Albumina (g/dL)	2,36 (0,07)	2,46 (0,05)	0,26	0,66	0,10
PPT (g/dL)	6,53(0,21)	6,26 (0,12)	0,27	0,33	0,76
Haptoglobina (g/L)	1,23 (0,14) ^b	0,9 (0,08) ^a	0,04	0,005	0,95
Paraoxonase (U/mL)	67,29 (2,19) ^b	15,55 (1,26) ^a	<0,0001	0,85	0,48
GGT (U/L)	92,56 (29,48) ^b	209,2 (17,02) ^a	0,0009	0,95	0,87

Sadias: Animais que não vieram a apresentar diarreia; Diarreia: Animais que posteriormente tiveram o acometimento clínico de diarreia. Parâmetros: PPT = Proteínas plasmáticas totais; GGT = γ -glutamilttransferase.

^{ab}Médias seguidas de letras minúsculas diferentes no mesmo parâmetro diferem entre grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

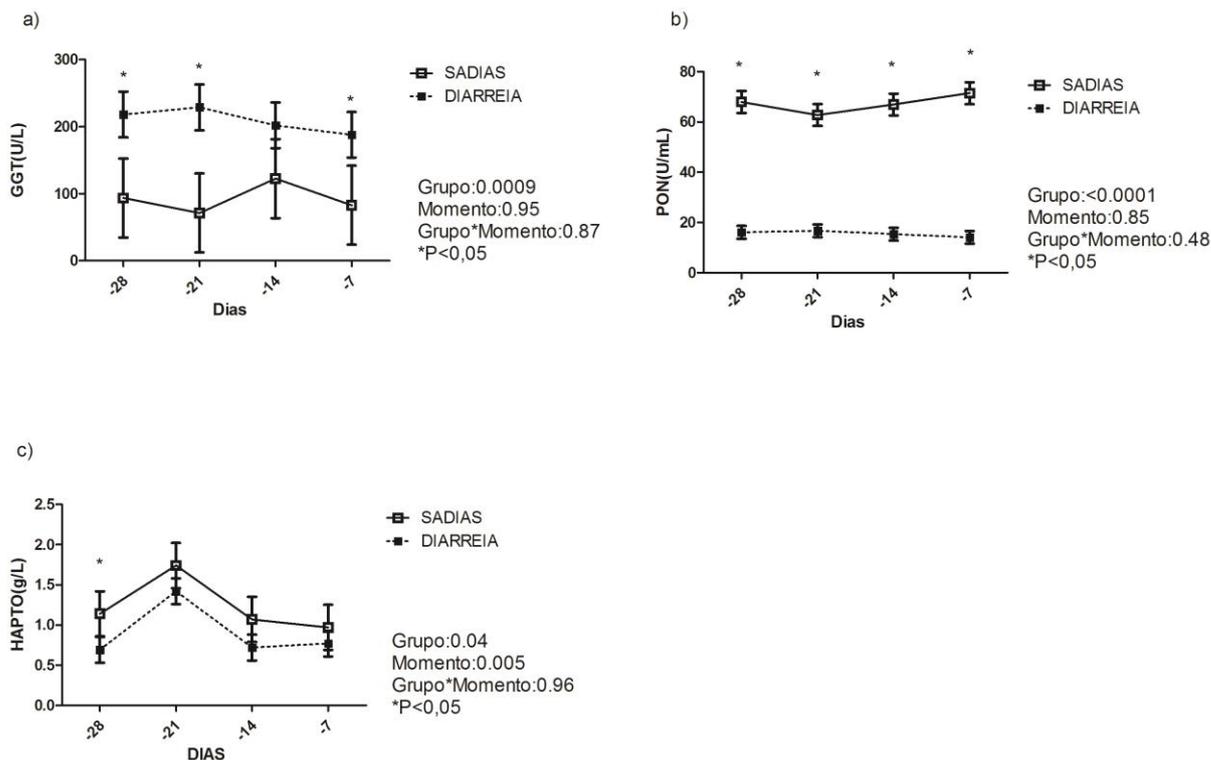


Figura 1. Parâmetros metabólicos de bezerras avaliadas semanalmente, anterior ao acometimento clínico por diarreia.

Sadias: Animais que não vieram a apresentar diarreia; Diarreia: Animais que posteriormente tiveram o acometimento clínico de diarreia.

a) γ -glutamilttransferase (GGT); b) Paraoxonase 1 (PON); c) Haptoglobina (HAPTO).

Quanto a comparação entre os diferentes tratamentos de diarreia, não foi observado diferença nas análises metabólicas de PPT, ureia e globulinas (tabela3). Para análise de glicose, (figura2) o grupo ATB+SO e SE mantiveram níveis semelhantes aos animais do grupo SADIAS ($P>0,05$). O grupo ATB apresentou as maiores médias e o grupo ATB+SE, as menores médias de glicose ($P<0,05$).

Quanto aos níveis de GGT (figura2), os animais do grupo ATB+SE foram os únicos que mantiveram valores semelhantes ao grupo SADIAS ($P>0,05$), sendo que este último diferiu dos demais grupos ($P<0,05$). A albumina (figura2) do grupo ATB foi a menor média dentre os grupos ($P<0,05$), sendo que somente o grupo SE apresentou valores semelhantes ao grupo SADIAS ($P>0,05$). Quanto a haptoglobina (figura2), somente o grupo SE diferiu do grupo SADIAS, ATB e ATB+SE ($P<0,05$), sendo o grupo ATB+SO foi

semelhante a todos os grupos ($P>0,05$). Na avaliação da PON1 (figura2), todos os grupos tiveram menores valores que o grupo SADIAS($P<0,0001$).

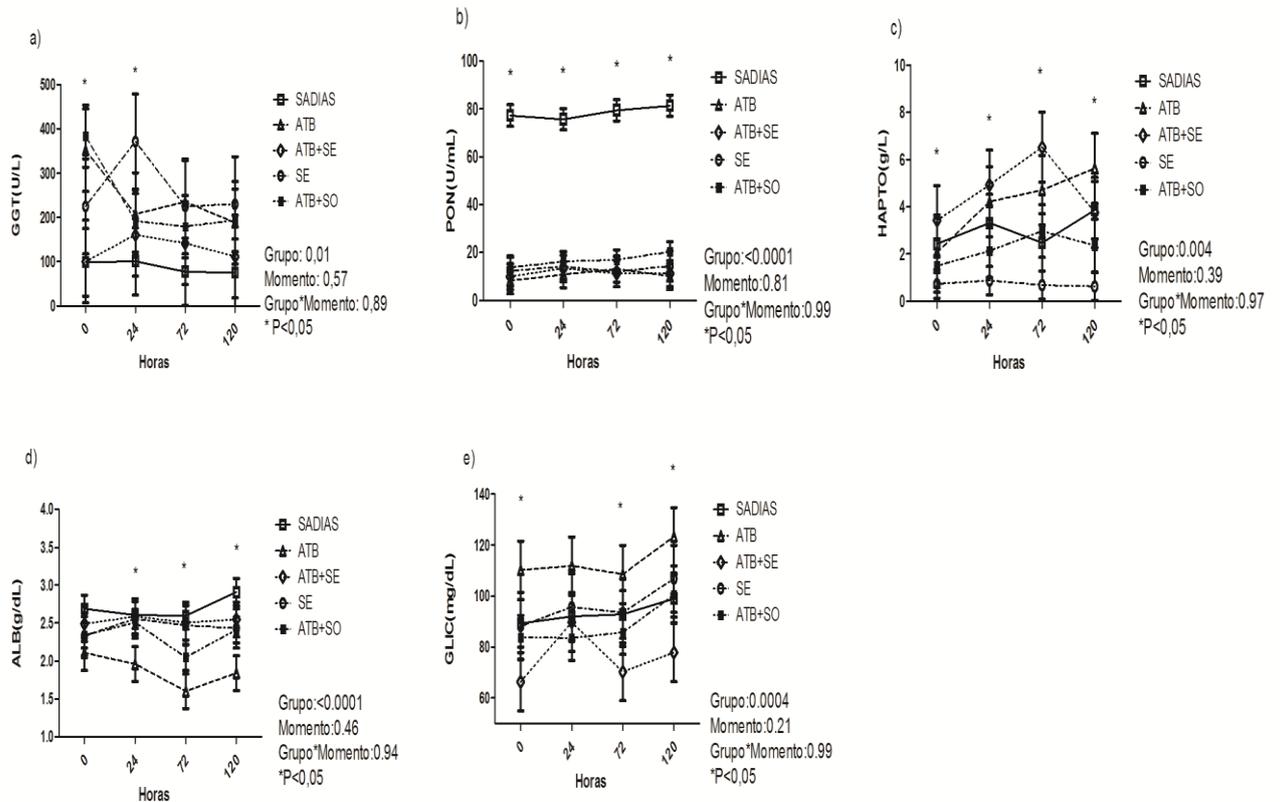


Figura 2. Parâmetros metabólicos de bezerras submetidas a administração de enrofloxacino de rápida ação associada ou não a tratamento suporte.

Sadias: animais sem acometimento de diarreia; ATB: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação; ATB+SE: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação associado a suporte endovenoso; SE: animais submetidos a suporte endovenoso; ATB+SO: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação associado a suporte oral.

a) γ -glutamilttransferase; (GGT) b) Paraoxonase 1 (PON); c) Haptoglobina (HAPTO); d) Albumina (ALB); e) Glicose (GLIC).

Quanto as análises dos eletrólitos, os níveis séricos de sódio diferiram entre grupos (figura3; $P < 0,0001$), sendo que o grupo ATB + SO foi o único grupo em que os níveis de sódio se mantiveram semelhantes aos níveis de bezerras saudias ($P > 0,05$). Os grupos ATB e ATB + SE diferiram entre si ($P < 0,05$). Os níveis de potássio diferiram entre os grupos (figura3; $P = 0,02$), sendo que os grupos ATB, SE e ATB + SO obtiveram maiores valores que o grupo SADIAS ($P < 0,05$). Na análise de cloretos (figura3), o grupo ATB+SO foi o único a manter os níveis semelhantes ao grupo SADIAS ($P > 0,05$), e ambos diferiram do grupo SE ($P < 0,05$).

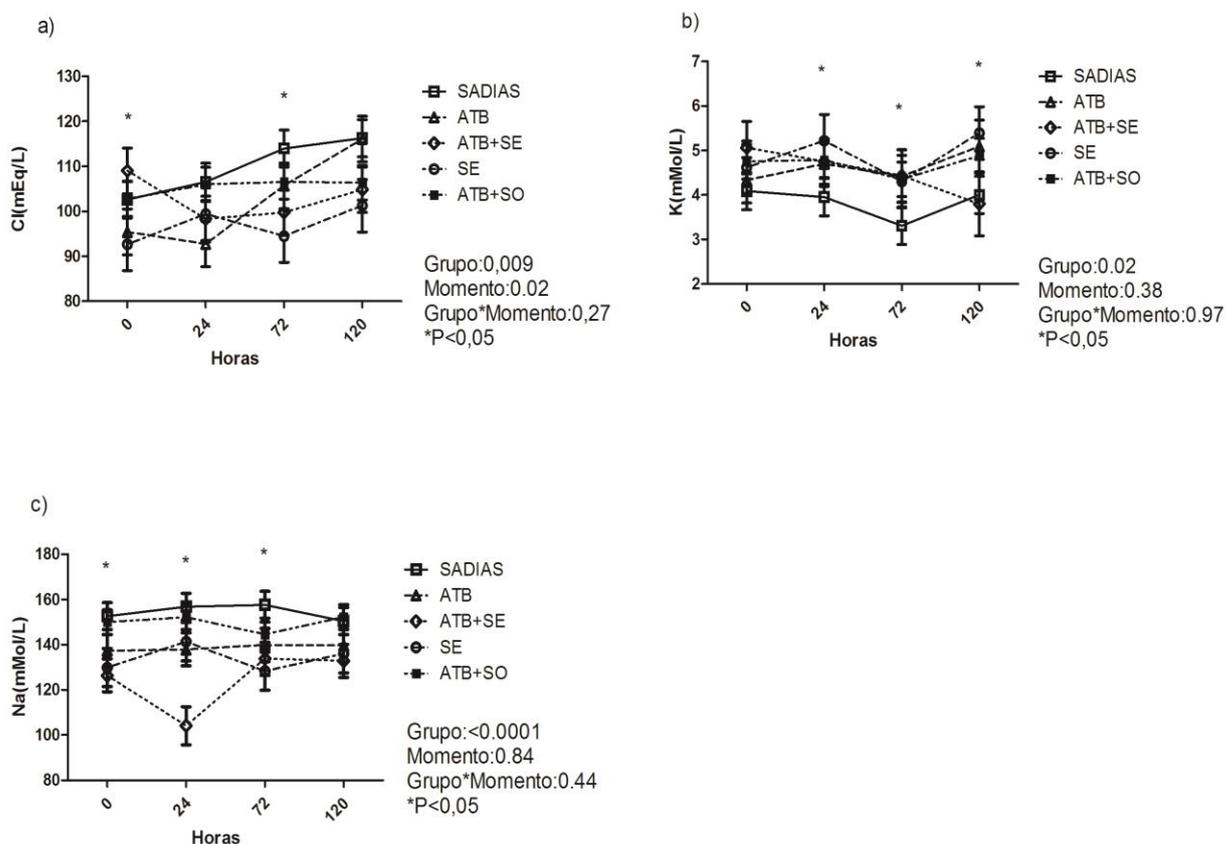


Figura 3. Níveis séricos de eletrólitos de bezerras submetidos a administração de enrofloxacino de rápida ação associada ou não a tratamento suporte.

Sadias: animais sem acometimento de diarreia; ATB: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação; ATB+SE: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação associado a suporte endovenoso; SE: animais submetidos a suporte endovenoso; ATB+SO: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação associado a suporte oral.

a) Cloretos (Cl); b) Potássio (K); c) Sódio (Na).

O grupo ATB + SE apresentou menores valores de ânion gap comparado aos demais grupos (figura4; $P=0,0002$). Quanto à osmolaridade, os grupos ATB e ATB + SO apresentaram valores semelhantes de osmolaridade (figura4), e tiveram maiores valores que os demais grupos ($P<0,05$); os grupos ATB e ATB + SE diferiram também entre si ($P<0,05$). Os níveis de bicarbonato de sódio tenderam a diferir entre os grupos (tabela3; $P=0,09$).

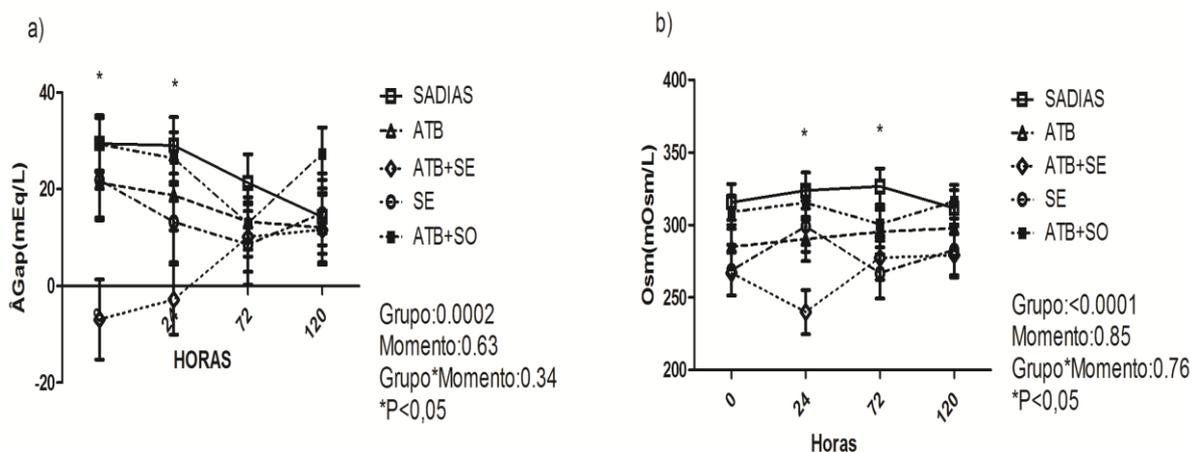


Figura 4. Ânion Gap e osmolaridade de bezerras submetidos a administração de enrofloxacino de rápida ação associada ou não a tratamento suporte.

Sadias: animais sem acometimento de diarreia; ATB: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação; ATB+SE: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação associado a suporte endovenoso; SE: animais submetidos a suporte endovenoso;

ATB+SO: animais submetidos a tratamento com enrofloxacino de rápida ação associado a suporte oral.

a) Ânion Gap (ÂGap); b) Osmolaridade (Osm).

Tabela 3. Médias e erro médio padrão de parâmetros metabólicos de bezerros submetidos a diferentes tratamentos para diarreia neonatal bovina.

Parâmetros	Grupos					Significância (valor de P)		
	Sadias	ATB	ATB+SE	ATB+SO	SE	Grupo	Momento	Grupo* Momento
Albumina (g/dL)	2,7 (0,09) ^a	1,88 (0,11) ^c	2,54 (0,11) ^{ab}	2,33 (0,08) ^b	2,45 (0,13) ^{ab}	<0,0001	0,46	0,94
Globulinas (g/dL)	3,73 (0,23)	4,27 (0,28)	3,55 (0,21)	3,26 (0,33)	3,77 (0,22)	0,21	0,67	0,99
PPT (g/dL)	6,63 (0,23)	6,26 (0,29)	6,08 (0,29)	6,1 (0,22)	5,71 (0,33)	0,22	0,34	0,99
Haptoglobina(g/L)	3,02 (0,6) ^{ab}	4,16 (0,74) ^a	4,66 (0,74) ^a	2,24 (0,56) ^{bc}	0,74 (0,85) ^c	0,004	0,39	0,97
Paraoxanase(U/mL)	78,54 (2,23) ^a	10,64 (2,73) ^b	11,51 (2,73) ^b	16,9 (2,07) ^b	13,28 (3,16) ^b	<0,0001	0,81	0,99
GGT (U/L)	87,85 (38,09) ^a	245,46 (46,55) ^b	128,51 (46,64) ^{ab}	237,09 (35,26) ^b	262,74 (53,86) ^b	0,01	0,57	0,89
Ureia (mg/dL)	30,04 (3,3)	32,56 (4,05)	31,19 (4,05)	33,25 (3,16)	33,83 (4,67)	0,94	0,21	0,91
Glicose (mg/dL)	93,25 (4,65) ^a	113,58 (5,7) ^b	76,05 (5,7) ^c	88,3 (4,31) ^{ac}	96,05 (6,58) ^a	0,0004	0,21	0,99
Cloretos (mEq/L)	109,84 (2,07) ^a	102,48 (2,54) ^{bc}	102,95 (2,54) ^{bc}	105,4 (1,92) ^{ab}	96,94 (2,93) ^c	0,009	0,02	0,27
Sódio (mmol/L)	154,39 (2,98) ^a	138,66 (3,65) ^b	124,28 (3,8) ^c	149,71 (2,76) ^a	133,86 (4,21) ^{bc}	<0,0001	0,84	0,44
Potássio (mmol/L)	3,84 (0,21) ^a	4,63 (0,27) ^b	4,51 (0,3) ^{ab}	4,69 (0,19) ^b	4,88 (0,29) ^b	0,02	0,38	0,97
Anion Gap(mEq/L)	23,54 (2,94) ^a	16,35 (3,59) ^a	3 (3,74) ^b	23,98 (2,72) ^a	14,66 (4,15) ^a	0,0002	0,63	0,39
Osmolaridade (mOsm/L)	319,45 (6,23) ^a	291,78 (7,63) ^b	265,87 (7,63) ^c	310,23 (5,77) ^a	279,41 (8,81) ^{bc}	<0,0001	0,85	0,76
Bicarbonato(mmol/L)	25,02 (0,36)	25,05 (1,06)	21,65 (1,06)	24,9 (0,8)	25 (1,22)	0,09	0,32	0,47

Grupos: Sadias = Animais que não apresentaram a doença;ATB = Antibiótico;ATB+SO = Antibiótico + Suporte Oral;ATB+SE = Antibiótico + Suporte Endovenoso;SE = Suporte Endovenoso; Parâmetros: PPT = Proteínas plasmáticas totais; GGT = γ -glutamilttransferase.

^{ab}Médias seguidas de letras minúsculas diferentes no mesmo parâmetro diferem entre grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

Quanto à expressão de genes ligados ao metabolismo (GHR1A e IGF1) e perfil inflamatório das bezerras ao nascimento (NFKB1, SOD2 e STAT3), não houve diferença na expressão dos mesmos entre os animais sadios e que desenvolveram diarreia posteriormente (tabela4; $P > 0,05$).

Tabela 4. Médias e erro médio padrão (EMP) da expressão gênica de bezerras ao nascimento e que posteriormente tiveram acometimento clínico para diarreia.

Genes	Médias (EMP)		Valor de P:
	Sadias	Diarreia	P
GHR1A	1(0,63)	1,57 (0,37)	0,72
STAT3	1 (0,24)	0,93 (0,15)	0,99
SOD2	1(0,19)	0,89 (0,11)	0,81
NFKB1	1(0,37)	1,28 (0,22)	0,50
IGF-1	1 (0,3)	1,42 (0,19)	0,14

Sadias: Animais que não vieram a apresentar diarreia; Diarreia: Animais que posteriormente tiveram o acometimento clínico de diarreia.

GHR1A: Gene do receptor do hormônio de crescimento bovino; IGF1: Gene do hormônio do crescimento semelhante a insulina 1; SOD2: Gene da superóxido desmutase 2; NFKB1: Gene do fator nuclear Kappa das células B 1; STAT3: Gene sinalizador da transdução e ativador da transcrição3.

Não houve diferença quanto ao ganho médio diário (GMD), altura de cernelha, perímetro torácico e largura de garupa (tabela5; $P > 0,05$) quando comparados animais que tiveram diarreia ou sadios. Também, quando relacionado a doença com os sistema de Abrigo ou Estaca não houve diferença quanto ao desempenho zootécnico (tabela5; $P > 0,05$).

Tabela 5. Médias e erro médio padrão dos parâmetros zootécnicos de bezerras sadias ou acometidas por diarreia, criadas em sistema de estacas ao ar livre ou abrigos individuais.

Parâmetro	Sadias		Diarreia		Valor de P	
	Abrigo	Estaca	Abrigo	Estaca	Doença	Doença* Sistema
Ganho médio diário (kg)	0,3 (0,06)	0,4(0,13)	0,33 (0,05)	0,33 (0,04)	0,62	0,61
Altura de cernelha (cm)	81,0 (1,4)	81,33 (3,1)	83,6 (1,2)	81,8 (0,93)	0,31	0,76
Largura de garupa (cm)	29,33 (0,51)	29,5 (1,13)	30,21 (0,43)	30,12 (0,34)	0,40	0,97
Perímetro torácico (cm)	77,8 (1,33)	79,83 (3,0)	79,05 (1,12)	79,0 (0,9)	0,41	0,82
Peso (Kg)	43,3 (1,72)	45,3 (3,84)	45,38 (1,45)	45,24 (1,16)	0,48	0,89

Sadias: Animais que não vieram a apresentar diarreia; Diarreia: Animais que posteriormente tiveram o acometimento clínico de diarreia.

DISCUSSÃO

A PON 1 mostrou ser um importante marcador precoce no diagnóstico de diarreia em bezerras. Este trabalho foi pioneiro em determinar a PON 1 como preditor diagnóstico de diarreia em bezerras e pode a partir de agora ser usado como uma referência no diagnóstico precoce desta enfermidade em bezerros. As relações estudadas até então eram relacionadas com algumas doenças, como metrite, laminite (Bionaz et al., 2013) e fígado gordo (Farid et al., 2013). Estudos mostraram que vacas com baixos níveis de PON1 no periparto apresentaram maior ocorrência de metrite e laminite enquanto que vacas com maiores níveis de PON1 nesta fase reduziram os riscos de apresentarem quadros graves de inflamação nos primeiros 30 dias em lactação (Bionaz et al., 2007). Neste mesmo trabalho, os animais doentes já apresentavam níveis reduzidos de PON1 desde o pré-parto, o que sugere que, mais do que um marcador metabólico precoce, a menor atividade desta enzima pode contribuir no desencadeamento de distúrbios patológicos. Avaliações feitas no periparto de vacas leiteiras demonstram que os animais que apresentaram maior ocorrência de infecções uterinas no pós-parto recente

possuíam uma redução mais drástica nos níveis de PON1 desde o pré-parto (Schneider et al., 2013). Da mesma forma em nossos resultados foi observada uma redução dos níveis de PON1 já 28 dias antes do acometimento clínico por diarreia, indicando que os baixos níveis desta proteína de fase aguda podem ser usados como indicador precoce da ocorrência de doenças também em neonatos bovinos, o que faz do nosso trabalho um pioneiro nesta avaliação.

A haptoglobina não foi eficaz para determinar se pode ser utilizado com esta finalidade de diagnóstico precoce de doenças, visto que esta é uma proteína de fase aguda positiva e os resultados foram inversos ao esperado. A concentração circulante de haptoglobina nos bovinos se apresenta reduzida em situações fisiológicas normais (Colla, 2009). Por outro lado, há um rápido aumento em sua concentração durante a fase aguda da inflamação e rápido decréscimo, quando o processo inflamatório cessa (Rubio et al., 2015), fato não observado no presente estudo. Lassila et al (2015) encontrou níveis de haptoglobina aumentados em bezerras com infecção entérica, mesma tendência encontrada por Idoate et al (2015) em bezerros confinados com infecção respiratória. Assim, os resultados sugerem que, em condições de campo, outras causas diferentes da condição sanitária das bezerras estão influenciando os valores de haptoglobina no soro. Embora não houve diferença na avaliação de PPT e albumina no período pré doença, tendo em vista o significado biológico das proteínas, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações, como a albumina, representam um importante auxílio ao diagnóstico clínico (Leal et al, 2003), porém não se mostraram bons marcadores preditivos. Já o aumento da GGT, previamente a diarreia, pode ser oriundo da maior síntese de proteínas no fígado, indicando um processo inflamatório que viria a ocorrer (Ganhein et al, 2003), porém a resposta em aumentos nos níveis de PPT e albumina não foi observada.

De acordo com o resultado de expressão gênica o acometimento por diarreia não esteve relacionado a condição metabólica e inflamatória destes animais ao nascimento, e sim, pela relação dos animais com ambiente e manejo aos quais foram expostos, o que já era esperado, visto que todos os animais apresentaram um padrão de expressão semelhante em todos os genes analisados. Em nível hepático, o aumento da expressão de IGF1 e GHR1A,

ilustra a maturação da vias metabólicas, como a via da gliconeogênese, essencial para o crescimento e desenvolvimento de bezerros (Hammon et al 2012). Segundo Butler et al. (2003), durante situações de baixa insulina plasmática, incluindo períodos de BEN, a expressão de GHR1A e IGF-1 é reduzida. Jacometo (2015), encontrou aumento da expressão de GHR1A e IGF-1 ao longo do tempo (4-28 dias de idade) em bezerros independente da dieta materna pré parto. Sobre marcadores de inflamação, a maior expressão de NFkB1 e SOD2 no metabolismo de bezerros, pode indicar uma resposta imune mais ativada (Osorio et al, 2014a), sendo que a suplementação com aminoácidos protegidos no rúmen de vacas durante o período de transição, aumentaram a expressão desses marcadores (Osorio et al., 2014a). Jacometo et al. (2015) encontrou maior expressão de SOD2 a nível hepático e uma tendência a maior expressão de NFkB1 em bezerros cujas mães receberam suplementação com metionina no período de transição, sendo um ponto positivo para o animal. Takeda et al (1999), demonstrou que animais que apresentavam menor expressão do gene sinalizador da transdução e ativador da transcrição 3 (STAT-3) em respostas de fase aguda, apresentavam comprometimento nas funções de defesa, visto que esses animais se mostravam altamente susceptíveis ao choque endotóxico e aumento da produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 e IFN- γ , também foi observado uma resposta imune polarizada do tipo Th1, com aumento da secreção de IFN- γ , e supressão na produção de IL-10, esses resultados sinalizam que o STAT-3 possui um papel fundamental na sinalização da resposta anti-inflamatória (Akira et. al. 2006). Assim, não havendo diferença na expressão gênica destes marcadores entre os grupos avaliados, podemos constatar que a ocorrência de doença se deu por fatores relacionados ao ambiente e manejo, e não por fatores metabólicos ligados ao desenvolvimento fetal, sendo todos os animais em condições metabólicas e inflamatórias semelhantes no início do estudo.

Quanto aos tratamentos para diarreia avaliados, os resultados obtidos neste estudo indicam que animais tratados com enrofloxacin de rápida ação aliada a tratamento suporte, em casos de diarreia, teve maior concentração sérica de GGT e manteve os níveis de PPT e globulina de animais saudáveis, indicando que estes animais apresentaram um proteinograma condizente com

uma resposta inflamatória mais efetiva (Leal et al, 2003). O aumento da GGT, nos casos de diarreia, pode ser oriundo da maior síntese de proteínas no fígado, pois doenças inflamatórias têm um significativo efeito nas mesmas, devido ao reparo tecidual (Ganhein et al, 2003). A manutenção do nível sérico de PPT, igualmente aos animais sadios, nos casos tratados com enrofloxacina de rápida ação aliada a tratamento suporte para diarreia, está associada a menor perda das proteínas por via intestinal (Leal et al, 2003; Santos et al., 2002). Já nas globulinas, a manutenção nos tratamentos para diarreia pode estar associado à migração das mesmas, como parte à resposta de fase aguda em processos inflamatórios (Meyer & Harvey, 2004). Já a albumina tem uma atuação importante na manutenção da função coloidosmótica sanguínea (Leal et al, 2003) e no transporte de drogas e outras moléculas, sua síntese é inversamente proporcional à síntese das proteínas de fase aguda (Jain et al, 2011). Portanto, a manutenção dos níveis de albumina nos grupos tratados com antibiótico com suporte pode ser caracterizada por uma menor resposta inflamatória, visto que Santos et al.(2002) encontrou valores diminuídos de albumina sérico em bezerros após a infecção por *Salmonella typhimurium*. Assim sendo, animais tratados com enrofloxacina, juntamente com tratamento suporte, parecem ter menos agressão aos tecidos intestinais e uma resposta inflamatória mais efetiva. Pode ser observado que o tratamento com antibiótico em associação com a reposição oral de energia e eletrólitos foi efetivo em manter os níveis de sódio, evitando a hiponatremia causada pela diarreia (Santos et al., 2002). Silva (2007) constatou hiponatremia nos bezerros inoculados com *Salmonella* Dublin, o que provavelmente está relacionado a gravidade e ao tempo de duração do quadro de diarreia. Quanto ao aumento nos níveis de potássio, pode ser devido a composição do produto utilizado para suporte por via oral, o qual contém potássio em sua composição. Também, a hipercalemia pode ser desencadeada pela liberação de potássio do interior das células para o sangue, observada nos animais tratados somente com antibiótico (grupo ATB) ou não tratados com antibiótico, recebendo somente suporte e reposição endovenosa de fluidos (grupo SE). Este mecanismo de efluxo de potássio da célula é desencadeado durante a maturação das citocinas, ativadas durante o processo inflamatório (Perregaux & Gabel, 1994).

Ainda, a hipercalemia indica que estes animais tiveram uma maior severidade da doença, com maior acidemia e desidratação (Trefz et al., 2015).

Já o cloreto e o bicarbonato constituem os ânions predominantes no meio extracelular, enquanto os fosfatos e as proteínas representam a maior parte dos ânions intracelulares (Leal et al., 2012). Dessa forma, a diminuição da concentração de cloretos no grupo SE e a tendência de bicarbonato mais baixo no grupo ATB+SE está relacionada com a gravidade da diarreia, uma vez que a perda de eletrólitos ocorre juntamente com as fezes. Santos et al. (2002) verificaram redução na concentração sérica de cloretos em bezerros experimentalmente infectados com *Salmonella Typhimurium*.

Não foi constatada diferença significativa no teor sérico de ureia nos bezerros avaliados. De forma contrária, Silva (2007), em estudo com salmonelose em bezerros, constatou aumento progressivo do teor sérico de ureia entre 24 e 156 horas após inoculação de *Salmonella Dublin*, associado ao grau de desidratação apresentado pelos animais inoculados. Já a hipoglicemia observada no grupo ATB+SE, ocorreu provavelmente em decorrência da anorexia, má digestão e absorção e, por conseguinte, da redução da gliconeogênese hepática e aumento da glicólise anaeróbica (Van Cleef et al., 2009), porém seus níveis não diferiram do grupo ATB+SO, sendo que neste grupo seria esperado maiores níveis de glicose, por se tratar de uma solução energética. Já a hiperglicemia observada no grupo ATB, se deve provavelmente a falta de suporte eletrolítico, o que gerou um desafio metabólico maior, com provável aumento de cortisol (Oliveira et al., 2015).

O ânion Gap é calculado a partir dos níveis sanguíneos de cátions e ânions, portanto sua concentração também é diretamente dependente das concentrações séricas desses íons, que, por sua vez, sofrem alterações em decorrência da patogenia da diarreia (Constable, 1996). Em nosso estudo o grupo ATB+SE, apresentou menor valor de ânion gap que os demais grupos em virtude da hiponatremia (Costa, 2008). Da mesma forma, a osmolaridade plasmática (LEC) é diretamente dependente da concentração sérica dos eletrólitos, principalmente do sódio, o que pôde ser observado neste estudo, onde somente o grupo ATB + SO foi capaz de manter os níveis de sódio e a osmolaridade semelhantes ao grupo SADIAS, demonstrando que os demais

grupos apresentaram redução do LEC e desidratação (Rose & Post, 2001; Freitas et al., 2010).

Os animais, independentemente do grupo experimental, não apresentaram diferenças no desenvolvimento corporal durante o período experimental. No entanto, é sabido que animais enfermos utilizam seus nutrientes para montar uma resposta imune que conduz à sua sobrevivência, em vez de utilizar os nutrientes para o desenvolvimento corporal (Gifford et al., 2012). Assim sendo, mesmo passando pelo curso da doença, pôde-se notar que os tratamentos estabelecidos não permitiram que os animais apresentassem um déficit de desenvolvimento. Quanto ao sistema de criação, não houve diferença entre a criação em abrigos individuais e estacas, o que corrobora com estudos que mostram que o uso de abrigos individuais fechados, promove a redução da disseminação de doenças, porém há um aumento da carga microbiana (Nordlund, 2008). Já a criação em estacas ao ar livre aumenta o poder de observação sobre o animal, facilitando a identificação imediata dos primeiros sinais de doenças, além de ter uma maior mobilidade. Como desvantagens, os bezerros criados em estacas estão sujeitos ao clima desfavorável (Muller, 2011).

CONCLUSÃO

A atividade de paraoxonase mostrou ser um importante marcador precoce no diagnóstico de diarreia em bezerras, porém a haptoglobina necessita de mais estudos para determinar se pode ser utilizado com esta finalidade. A solução de reposição oral auxiliou na resposta à antibioticoterapia, por determinar um perfil protéico condizente com uma resposta inflamatória mais efetiva, demonstrando uma manutenção dos níveis protéicos, além de apresentar um perfil eletrolítico semelhante a animais sadios, enquanto a fluidoterapia endovenosa melhorou a condição clínica de animais com diarreia por manter a volemia e os parâmetros protéicos.

REFERÊNCIAS

AKIRA, Shizuo et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

BARRINGTON, G. M et al. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 7-34, 2002.

BERCHTOLD, Joachim et al. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 73-99, 2009.

BIONAZ, Massimo et al. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR research**, v. 2013.2013.

BIONAZ, MASSIMO 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.

BROWNE, Richard 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.

BUTLER ST, et al. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal Endocrinology**.176: 205-217.

COLLA, MF et al. Valor da haptoglobina no plasma comparado com a contagem de células somáticas do leite no diagnóstico da mastite subclínica em vacas leiteiras. 2009. 67 f. Diss. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CONNELL, G. F et al. Human Haptoglobins: Estimation and Purification. **Biochemical Journal**. V. 72, p. 115-121, 1959.

CONSTABLE, P. D et al. 1996. Visna-like disease in a ram with chronic Demyelinatingencephalitis. **Journal Animal Veteterinary Medicine Association**. 208:117-120.

COSTA, N. S., et al. "Hemogram and blood gas analysis of equines submitted to jejuni experimental obstruction." **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60.6 (2008): 1367-1374.

CRAY, C et al. Acute phase proteins in animals. *Prog. Mol. Bio. Transl. Science*, v.105, p.113-150, 2012.

do Rêgo LEAL¹, Marta Lizandra, et al. "Proteinograma sérico de bezerras saudáveis, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento." **Brazilian Journal veterinary Research animal Science** 40 (2003): 2.

FARID, Ayman Samir et al. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 73, 2013.

FREITAS, Moisés Dias et al. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2608-2615, 2010.

GANHEIM, C.; et al. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or Mannheimia haemolytica. **Journal Veterinary Medicine**, v.50, p.183-190, 2003.

GIFFORD C. A., et al. 2012. Impacts of inflammation on cattle growth and carcass merit. **Journal Animal Science** 90:1438-1451.

GONÇALVES, R.C.; et al. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Ciência Rural**, v.31, p.263-269, 2001.

GONZÁLEZ, F.H.D. et al. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anal. Vet. Mur.*, v.23, p.5-17, 2007.

GRAHAM, T.W.; et al. Biological markers of neonatal calf performance: the relationship of insulin-like growth factor-I, zinc, and copper to poor neonatal growth. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2585-2593, 2010.

HAMMON, H. M. et al. Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: endocrine changes and responses to milk-borne and systemic hormones. **Domestic animal endocrinology**, v. 43, n. 2, p. 171-185, 2012.

HULTÉN, C.; et al. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobins markers of treatment efficacy in pigsexperimentally infected with *Actinobacilluspleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 75–89, 2003.

IDOATE, I., et al. (2015). Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. **Veterinary immunology and immunopathology**, 163(3), 221-226.

JACOMETO, Carolina Besspalhock et al. Tese de doutorado. PPGBIOTEC UFPel. Nutrição materna: Efeitos no metabolismo e programação imunometabólica de neonatos bovinos, 2015.

JAIN, S.; et al. Acute phase proteins: As diagnostic tool. **J Pharmacology Biological Science**, v.3, p.118-127. 2011.

KRAUSE, Ana Rita 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.

LARSON, et al. Guidelines towards more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, v. 60. p. 989–991, 1977.

LEAL, M. L. R. et al. Intravenous hypertonic saline solution (7.5%) and oral electrolytes to treat of calves with noninfectious diarrhea and metabolic acidosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 4, p. 1042-1050, 2012.

LOHAKARE, J. D. et al. Effects of limited concentrate feeding on growth and blood and serum variables, and on nutrient digestibility and gene expression of

hepatic gluconeogenic enzymes in dairy calves. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 96, n. 1, p. 25-36, 2012.

LOPES, Marcos Aurélio; et al. Influência de diferentes índices zootécnicos na composição e evolução de rebanhos bovinos leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 446-453, 2009.

LORENZ, I.; VOGT, S et al. Investigations on the Association of D-lactate Blood Concentrations with the Outcome of Therapy of Acidosis, and with Posture and Demeanour in Young Calves with Diarrhoea. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, n. 9, p. 490-494, 2006.

MASTERNAK, Michal M. et al. Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 8, p. 679-684, 2005.

MENDES, R. S., et al. 2012. Perfil leucocitário e eficácia clínica da enrofloxacina (fórmula BAIK9) em dose única no tratamento de cães com gastroenterite por Parvovírus. **Ciencia Veterinária RPCV**. 111:43-49.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W et al. Hepatobiliary and skeletal muscle enzymes and liver function tests. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis**. 3rd ed. St. Louis, MO: Saunders, p. 169-192, 2004.

MOTA R.A., et al 2000. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarreias em bezerros e leitões. **Hora Veterinária, Porto Alegre**, 118:21-24, 2000.

MÜLLER, Mylene; et al. Efeito de diferentes instalações sobre o comportamento ingestivo de bezerros da raça holandesa. **Revista da 9ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa. Dom Pedrito, Urcamp**, p. p17, 2011.

MURATA. H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004.

NAYLOR, J.M., et al. Advances in oral and intravenous fluid therapy of calves with gastrointestinal disease. In: **World Buiatrics Congress**, 24., Nice, Paris. p.139-150, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

NORDLUND, Kenneth V et al. Practical considerations for ventilating calf barns in winter. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24,n.1, p. 41-54, 2008.

OLIVEIRA, F. L. C. et al. Effects of sudden intake of melon on blood gas, biochemical and hematological parameters of sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p. 1272-1278, 2015.

ORRO, T. ; et al. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 182-187, 2008.

OSORIO JS, et al (2013) Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of Dairy Science** 96(10):6248–6263.

OSORIO JS, et al. (2014a). Smartamine M and MetaSmart supplementation during the peripartal period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. **Journal of dairy science**, 97(12), 7451-7464.

PETERSEN, H.H.; et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

PERREGAUX, David; GABEL, Christopher A et al. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 21, p. 15195-15203, 1994.

RADCLIFF, R.P; et al. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3933-3940, 2003.

RAISER, A. G et al. Alterações no equilíbrio hidroeletrólítico. In: RAISER, A. G. **Patologia cirúrgica veterinária**. Santa Maria, cap.01, p. 01-21, 2003.

REIS, G.L.; et al. 2008. Predição de peso vivo a partir de medidas corporais Emanimais mestiços Holandês/Gir. **Ciencia Rural**. 38(3):778-783.

ROCHA, Paulo Novis et al. Hyponatremia: basic concepts and practical approach. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 2, p. 248-260, 2011.

ROSE, D.B., POST, T.W et al. **Clinical physiology of acid – base and electrolyte disorders**. 5ed. New York: McgrawHill, 2001. 992p.

RUBIO, Camila Peres; et al. Proteínas de fase aguda em cães: Possíveis aplicações em cirurgia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 4, p. 492-502, 2015.

RUSSELL, Karen E.; ROUSSEL, Allen J et al. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403-426, 2007.

SEPPÄ-LASSILA, Leena et al. Intestinal pathogens, diarrhoea and acute phase proteins in naturally infected dairy calves. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 41, p. 10-16, 2015.

SANTOS, R. L., et al. 2002. Hematologic and serum biochemical changes in Salmonella ser Typhimurium Infected calves. Am. **Journal Veterinary Research**

.63(8):1145-1150.

SCHNEIDER, A.; et al. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 269-271, 2013.

SCHNEIDER, Augusto et al. Insulin-like growth factor and growth hormone receptor in postpartum lactating beef cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 8, p. 925-931, 2010.

SILVA, D. G. Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin. 2007. 153f. 2007. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

TAKEDA, Kiyoshi et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 39-49, 1999.

TREFZ, F.M., et al. Effects of Alkalinization and Rehydration on Plasma Potassium Concentrations in Neonatal Calves with Diarrhea. **Journal Veterinary Internacional Medicine**, v. 29, p. 696–704, 2015.

UETAKE, K et al. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 101-105, 2013.

VAN CLEEF, H. Eric et al. Distúrbios metabólicos por manejo alimentar inadequado em ruminantes: novos conceitos. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 1, n. 2, p. 319-341, 2009.

YUMET, G.; et al. Hepatic growth hormone resistance during sepsis is associated with increased suppressors of cytokine signaling expression and impaired growth hormone signaling. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 1420-1427, 2006.

**6. Artigo 2 - A ser submetido na revista Brazilian Journal of Veterinary
Research and animal science**

**MARCADORES METABÓLICOS COMO PREDITORES DE
BRONCOPNEUMONIA EM NEONATOS BOVINOS**

RESUMO

Durante as primeiras semanas de vida, distúrbios do trato respiratório apresentam alta incidência em neonatologia bovina, necessitando de diagnóstico e tratamento rápidos para que se obtenha uma boa resposta clínica. O objetivo deste estudo foi determinar possíveis marcadores para diagnóstico precoce e monitoramento da resposta clínica e desenvolvimento corporal de neonatos bovinos acometidos por broncopneumonia. Foram utilizadas 18 bezerras da raça Holandês, monitoradas do nascimento até 42 dias de vida através de avaliação zootécnica, biópsias hepáticas ao nascimento (expressão de genes ligados ao metabolismo e perfil inflamatório) e coletas de sangue periódicas até o diagnóstico de broncopneumonia para avaliação de proteínas de fase aguda, PPT e GGT. Durante o estudo 6 bezerras se mantiveram saudáveis e 12 apresentaram broncopneumonia. Os níveis séricos de paraoxonase mostraram ser um importante marcador precoce no diagnóstico de broncopneumonia em bezerras. A expressão de genes ligados ao metabolismo e perfil inflamatório pré-natal não tiveram relação com a ocorrência de doença neste estudo, indicando que as causas de broncopneumonia foram fatores ligados ao manejo e imunidade dos neonatos após o nascimento. Ainda, parâmetros zootécnicos não tiveram interferência da doença e nem do sistema de criação. Nosso estudo foi eficaz em determinar a paraoxonase (PON 1) como preditor diagnóstico de broncopneumonia em neonatos bovinos.

INTRODUÇÃO

A primeira semana de vida de uma bezerra é o período de maior desafio, sendo responsável por 50% das mortes no primeiro ano de vida. A saúde da bezerra é diretamente ligada a eficaz transferência de imunidade passiva e ambiente higiênico (Lopes, 2009). Durante as primeiras semanas de vida os distúrbios do trato respiratório têm maior incidência. A broncopneumonia representa perdas econômicas para o produtor de leite, em virtude da morte dos animais, custos com tratamento, assistência médica veterinária e principalmente pelo atraso no ganho de peso dos animais (Gonçalves et al, 2011).

A broncopneumonia é uma doença de causa multifatorial, que requer a combinação ativa de um ou mais agentes infecciosos e do meio ambiente com o hospedeiro para que possa se desenvolver (Snowder et al., 2008). Esta enfermidade é apontada como uma das principais causas de óbito em animais com falha na transferência passiva de imunidade (Borges, 1997), e responsável por grandes perdas econômicas em bezerros confinados (Gonçalves et al, 2011). Na tentativa de diminuir os prejuízos econômicos dessa enfermidade é essencial ter um diagnóstico rápido, sendo a quantificação de proteínas de fase aguda, uma boa alternativa para auxiliar no diagnóstico precoce de enfermidades (Krause et al., 2014).

Na resposta de fase aguda são liberados mediadores da resposta imune, como as citocinas e causam, além de outros efeitos, a variação nas concentrações de proteínas presentes no plasma, como a haptoglobina e paroxanase 1 (PON1) (Krause et al., 2014), quando quantificadas no plasma, podem ser úteis no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da evolução de doenças (Murata et al. 2004; González et al 2007; Jain et al. 2011; Cray, 2012).

Além disso, o conhecimento das alterações metabólicas que ocorrem em bezerros neonatos se torna uma eficaz ferramenta de diagnóstico em situações de morbidez, permitindo o monitoramento da função do organismo (Russel & Roussel, 2007). Ainda, a avaliação da expressão gênica em animais fornece evidências dos elementos envolvidos no diagnóstico, prognóstico e evolução das doenças (Schneider et al., 2010). O estudo de expressão de genes ligados ao metabolismo e resposta inflamatória traz informações sobre características de maior resistência a doenças e desenvolvimento corporal

(Lohakare et al., 2012), sendo que efeitos sobre essas características podem ocorrer ainda no período pré natal (Osorio et al., 2013).

Com isto, o objetivo deste estudo foi determinar marcadores preditivos de broncopneumonia em neonatos bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) aprovou todos os procedimentos realizados neste experimento (código CEEA: 2827).

Foram monitoradas 70 bezerras da raça Holandês, sendo utilizadas neste estudo 18 bezerras, avaliadas desde o nascimento até a sexta semana de vida.

Animais e Instalações

Este estudo foi realizado em uma fazenda comercial localizada no sul do Rio Grande do Sul - RS (32,8°16'S, 52,8°32'L). Foram monitoradas 70 bezerras da raça Holandês, sendo utilizadas 18 bezerras neste estudo, avaliadas desde o nascimento até a sexta semana de vida. Após o parto, os animais permaneceram aproximadamente 12 h com as vacas, a fim de receberem colostro naturalmente, de acordo com o manejo da fazenda, sendo posteriormente alojados nas instalações de cria e recria.

Os animais foram mantidos em abrigos individuais ripados de 1 m², cobertos e suspensos a 1,5 m do solo (Abrigo, n=10), ou alocados em estacas individuais – diretamente no solo e sem cobertura (Estaca, n=8). A dieta fornecida aos animais era composta de quatro litros de leite por dia, divididos em duas refeições (7 e 17 h), com acesso livre ao concentrado inicial peletizado (Supra Terneira Laminado, Supra[®], São Leopoldo, Brasil) de acordo com o NRC (2001) e água *ad libitum*.

Biópsias hepáticas e análises de expressão gênica

No primeiro dia de vida foram realizadas biópsias hepáticas em todas as bezerras. As biópsias hepáticas transcutâneas foram realizadas no 11^o espaço intercostal com uma agulha apropriada de 20 cm de comprimento, após a tricotomia e anestesia local com 7 mL de lidocaína a 2% na região da incisão (RADCLIFF et al., 2003). Após a biopsia foi aplicada uma dose de flunixinim

meglumine (Flunamine®, Bayer Saúde Animal, Alemanha), em dose de 1,1 mg/kg, por via intramuscular, e curativo da ferida cirúrgica com iodopovidine durante 3 dias. As amostras de tecido hepático foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento da análise. O RNA total foi extraído pelo método do Trizol, tratadas com DNase e purificadas utilizando o kit RNeasy (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em NanoDrop (ThermoScientific) e a integridade verificada através de eletroforese em gel de agarose. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o iScript™ Synthesis Kit (BIORAD, Hercules, CA, EUA) com 1 µg de RNA total em um volume final de 20 µL. As reações foram conduzidas em um termociclador (MyCycler™ ThermalCycler, BIO RAD, Hércules, Florida, EUA), de acordo com o seguinte protocolo: 5min à 25 °C, 30min à 42 °C e 5min à 85 °C. O produto final foi diluído para 5 ng/ul. Foi realizado o PCR em tempo real usando SYBR Green para avaliar a expressão dos genes GHR1A, IGF1, SOD2, NFKB1 E STAT3, e o UXT foi utilizado como controle endógeno. As sequências dos iniciadores (primers), posição de hibridização, tamanho do amplicon estão listados na Tabela 1. A sequência do amplicon está listada na tabela suplementar. As reações de PCR foram realizadas em duplicata com volume de 10 µL, utilizando 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,4 µL de cada iniciador (10 uM), 4 µL do cDNA e 0,2 µL de água ultrapura. As reações foram executadas no sistema ECO™ Real-Time PCR System (iLLumina®, San Diego, CA, EUA). Para cada ensaio foram corridos 40 ciclos (95 °C durante 3s e 60 °C durante 30s) e uma curva de dissociação foi incluído no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. Cada placa de ensaio incluiu um controle negativo usando água ultrapura. O coeficiente de variação foi inferior a 5% para todos os pares de iniciadores utilizados. A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene UXT na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene UXT na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle (animais sadios) foram ponderadas, e

todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo de controle (foldchange) (Masternak et al., 2005).

Tabela 1 Gene ID, número de acesso ao GenBank, posição de hibridização, sequência e tamanho dos primers para *Bos taurus* usados para análise de expressão gênica.

Gene ID	Acesso #	Gene	Pos.Hib.	Primers (5'-3')	pb
280805	AC_000177.1	GHR1A	F.	TCCAGCCTCTGTTTCAGGAG	64
			R.	GCTGCCAGAGATCCATACCT	
281239	AC_000162.1	IGF1	F. 166	CCAATTCATTCCAGACTTTGCA	103
			R. 268	CACCTGCTTCAAGAAATCACAAAA	
508541	AC_000176.1	STAT3	F. 3804	GGTAGCATGTGGGATGGTCTCT	95
			R. 3913	GCATCCCTAGAACTCTGGTCAA	
616115	AC_000163.1	NFKB1	F. 172	TCAACCGGAGATGCCACTAC	110
			R. 266	ACACACGTAACGGAAACGAAATC	
281496	AC_000166.1	SOD2	F. 620	TGTGGGAGCATGCTTATTACCTT	95
			R. 714	TGCAGTTACATTCTCCAGTTGA	
525680	AC_000187.1	UXT	F. 323	TGTGGCCCTTGGATATGGTT	101
			R. 423	GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG	

Tabela Suplementar. Gene e sequenciamento do produto da PCR dos primers utilizados neste experimento.

Gene	Sequenciamento dos Amplicons
IGF1	CCGGTACAGGGAATCAGCAGTCTCCACCCAATTATTTAAGTGCTGCTTTTGTGATTTCTTGAAGCAGGG GTGAAAA
STAT 3	GCATCCCTCTACGAGCACGGCTAGATGTGGTCGGCTACAGCCATCTTGTCTCAGTTGACCAGAGTTTCTA GGGATGCAA
NFKB 1	CGATATCTTCGTGTCAAGCAAAAAGTATTCGCAACACTGGAAGCACGAATGACAGATGCCTGTATACGGG GCATCAGAAGGCCGTA

SOD

2 GCATGTTTGGCCGATTATCTGAGGCCATTTGGAATGTGATCAACTGGGAGAATGTAAGTCAATAC

Exame Clínico

Durante o período experimental foram realizados exames clínicos duas vezes por semana em todos os animais. Além disso, foram observados diariamente o comportamento e condição clínica dos mesmos. Quando percebidas quaisquer alterações, o exame clínico foi realizado novamente, em busca de sinais indicativos de comprometimento do trato respiratório. Foram consideradas sadias as bezerras que não demonstraram alteração nos parâmetros do exame clínico até 42 dias de vida. Bezerras que apresentaram outras enfermidades foram excluídas do estudo.

Na avaliação clínica específica do aparelho respiratório, foi monitorado o tipo respiratório e presença de secreção nasal, assim como auscultação da área de projeção pulmonar no tórax para determinação da presença de estertores crepitantes (Gonçalves et al., 2001).

Coleta e processamento das amostras sanguíneas

Amostras de 10mL de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante uma vez por semana de todos os animais desde o nascimento até o aparecimento de sinais clínicos de broncopneumonia e/ou até a sexta semana de vida, em caso de animais que não apresentarem broncopneumonia. Após a coleta, o sangue foi submetido à centrifugação a 1800xg para obtenção de amostras de soro, as quais foram identificadas e congeladas a -70 °C.

Para avaliação do perfil metabólico anterior ao acometimento clínico foram utilizadas as coletas dos dias -28, -21, -14 e -7 em relação ao dia do diagnóstico de broncopneumonia. Foram determinados os níveis séricos de proteínas plasmáticas totais (PPT), gama glutariltransferase (GGT), albumina, PON1 e haptoglobina durante o período pré acometimento para broncopneumonia. Para análise de PPT, GGT e albumina foi utilizado conjuntos de reagentes de uso comercial da marca Labtest (Labtest, Belo Horizonte, Brasil). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de luz visível (BioEspectro® SP 220, Bioespectro, Curitiba, Brasil), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste. Para determinação da atividade PON1 no meio de MIV foi utilizado um protocolo previamente descrito

(Browne et al., 2007). Brevemente, foi utilizado um tampão Tris/HCl 20 mM, contendo 1 mM de cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:3) em Tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 µL da amostra diluída em 500 µL da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: Δ Absorbância x 115 x 3. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL. A haptoglobina foi mensurada através do método colorimétrico, pela reação de peróxido de hidrogênio com a hemoglobina que oxida o guaiacol liberando luz, segundo protocolo de Connell&Smithies (1959). Em todas as análises o coeficiente de variação foi inferior a 10%.

Avaliações zootécnicas

Semanalmente (desde o nascimento até 42 dias de vida), foram realizadas mensurações de altura da cernelha, largura da garupa e perímetro torácico. Nos mesmos dias, os animais eram pesados (para avaliação do ganho médio diário (GMD) com uso de fita de pesagem indicada para bovinos, sempre antes do fornecimento da dieta matutina (Reis, et al., 2008).

Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA). As variáveis foram analisadas através do método MIXED MODELS, considerando o grupo, o momento e suas interações como efeitos fixos, e os animais dentro do grupo como efeito aleatório. Variáveis que não apresentaram distribuição normal dos resíduos foram transformadas para log. P. Para os parâmetros zootécnicos foi considerado o sistema de criação, os grupos e suas interações. A comparação de médias foi feita através do teste de Tukey-Kramer.

RESULTADOS

Durante o período de avaliação 6 bezerras se mantiveram saudáveis e 12 apresentaram broncopneumonia. Quanto aos níveis de haptoglobina, albumina e GGT no período pré broncopneumonia, não houve diferença entre os animais que apresentaram ou não a doença (tabela2; $P > 0,05$), já a PON 1 foi menor nos animais que apresentaram a doença (figura1; $P < 0,0001$), mesmo comportamento observado na análise de PPT(figura1; $P = 0,01$).

Tabela 2. Médias e erro médio padrão de parâmetros metabólicos de bezerras avaliados anteriormente ao acometimento clínico de broncopneumonia.

Parâmetros	Grupos		Significância (valor de P)		
	Sadias	Broncopneumonia	Grupo	Momento	Grupo* Momento
Albumina (g/dL)	2,36 (0,07)	2,46 (0,05)	0,26	0,66	0,10
PPT (g/dL)	6,53(0,21) ^b	5,88 (0,15) ^a	0,01	0,92	0,33
Haptoglobina(g/L)	1,23 (0,15)	1,09 (0,1)	0,42	0,12	0,65
Paraoxanase(U/mL)	67,29 (2,25) ^b	13,47 (1,6) ^a	<0,0001	0,73	0,66
GGT (U/L)	92,56 (35,65)	172,58 (25,21)	0,07	0,73	0,71

Grupos: Sadias = Animais que não apresentaram a doença; Broncopneumonia: Animais que vieram a desenvolver a doença. Parâmetros: PPT = Proteínas plasmáticas totais; GGT = γ -glutamyltransferase.
^{ab}Médias seguida de letras minúsculas diferentes no mesmo parâmetro diferem entre grupos pelo teste de Tukey(P<0,05).

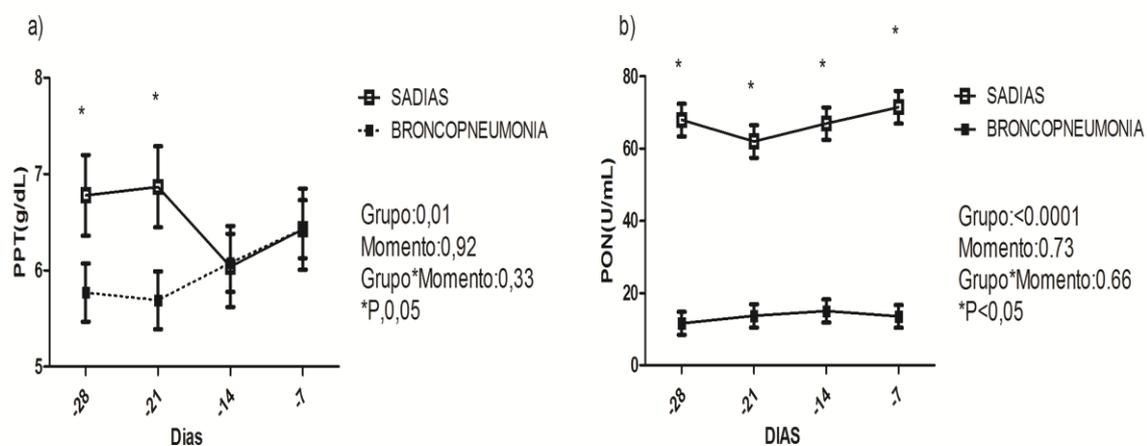


Figura 1. Parâmetros metabólicos de bezerras avaliadas semanalmente, anterior ao acometimento clínico por broncopneumonia.

Sadias: Animais que não vieram a apresentar broncopneumonia; Diarreia: Animais que posteriormente tiveram o acometimento clínico de broncopneumonia.

a) Proteínas plasmáticas totais (PPT); b) Paraoxonase 1 (PON).

Quanto à expressão de genes ligados ao metabolismo (GHR1A e IGF1) e perfil inflamatório das bezerras ao nascimento (NFKB1, SOD2 e STAT3), não houve diferença na expressão dos mesmos entre os animais sadios e que desenvolveram broncopneumonia posteriormente (tabela3; $P>0,05$).

Tabela 3. Médias e erro médio padrão (EMP) da expressão gênica de bezerras ao nascimento e que posteriormente tiveram acometimento clínico para broncopneumonia.

Genes	Médias (EMP)		Valor de P
	Sadias	Broncopneumonia	P
GHR1A	1,00 (0,63)	1,08 (0,45)	0,80
STAT3	1,00 (0,24)	0,95 (0,17)	0,90
SOD2	1,00(0,19)	0,88 (0,14)	0,77
NFKB1	1,00 (0,37)	1,10 (0,26)	0,56
IGF-1	1,00 (0,30)	1,08 (0,22)	0,49

Sadias: Animais que não vieram a apresentar broncopneumonia; Broncopneumonia: Animais que posteriormente tiveram o acometimento clínico de diarreia.

GHR1A: Gene do receptor do hormônio de crescimento bovino; IGF1: Gene do hormônio do crescimento semelhante a insulina 1; SOD2: Gene da superóxido desmutase 2; NFKB1: Gene do fator nuclear Kappa das células B 1; STAT3: Gene sinalizador da transdução e ativador da transcrição3.

Não houve diferença quanto ao GMD, altura de cernelha, perímetro torácico e largura de garupa quando comparados animais que tiveram broncopneumonia ou sadios (tabela4; $P>0,05$). Também, quando relacionado a

doença com os sistema de Abrigo ou Estaca não houve diferença quanto ao desempenho zootécnico (tabela4; $P>0,05$).

Tabela 4. Médias e erro médio padrão dos parâmetros zootécnicos de bezerras sadias, acometidas por broncopneumonia, criadas em sistema de estacas ao ar livre ou abrigos individuais.

Parâmetro	Sadias		Broncopneumonia		Valor de P	
	Abrigo	Estaca	Abrigo	Estaca	Doença	Doença* Sistema
Ganho médio diário (kg)	0,3 (0,06)	0,4(0,13)	0,31 (0,06)	0,25 (0,05)	0,56	0,69
Altura de cernelha (cm)	81,0 (1,4)	81,33 (3,1)	81,3 (1,4)	80,9 (1,2)	0,88	0,71
Largura de garupa (cm)	29,33 (0,51)	29,5 (1,13)	29,8 (0,5)	29,64 (0,43)	0,92	0,87
Perímetro torácico (cm)	77,8 (1,33)	79,83 (3,0)	77,6 (1,33)	77,45 (1,12)	0,43	0,72
Peso (Kg)	43,3 (1,72)	45,3 (3,84)	43,33 (1,72)	43,78 (1,45)	0,80	0,54

Grupos: Sadias = Animais que não apresentaram a doença. Broncopneumonia= Animais que apresentaram a doença.

DISCUSSÃO

A PON 1 foi um importante marcador precoce no diagnóstico de broncopneumonia em bezerras. A atividade sérica de PON1 em ruminantes também apresentou relação com outras doenças, como metrite, laminite (Bionaz et al., 2013) e fígado gordo (Faridet al.,2013). Diminuição de PON1 no periparto de vacas foi correlacionado com aumento de casos de metrite e laminite, ao contrário maiores níveis de PON1 nesta fase foi relacionado a maior saúde uterina nos primeiros 30 dias de lactação (Bionaz et al., 2007). Scheneider et al.(2013) relacionaram baixos níveis de PON1 no periparto de vacas com maior incidência de doenças uterinas no pós parto. Da mesma forma, em nossos resultados foi observada uma redução dos níveis de PON1

já aos 28 dias antes do acometimento clínico por broncopneumonia, indicando que os baixos níveis desta proteína de fase aguda podem ser usados como indicador precoce da ocorrência de doenças também em neonatos bovinos.

Porém a haptoglobina não foi eficaz para determinação do diagnóstico precoce de broncopneumonia, visto que nesse estudo não houve diferença entre animais sadios e doentes. Normalmente os níveis de haptoglobulina se mantêm baixos em situações fisiológicas (Colla, 2009) e o aumento da concentração de haptoglobina se dá durante a fase aguda da inflamação e a diminuição, ao término do processo inflamatório (Rubio et al., 2015). Lassila et al (2015) encontrou aumento de haptoglobina em bezerras com diarreia. Idoate et al (2015) em bezerros confinados com infecção respiratória também encontraram maiores níveis desta proteína.

O menor valor de PPT no período de 28 e 21 dias anteriores a doença, sugerem que os animais que tiveram posteriormente broncopneumonia poderiam estar menos imunocompetentes, visto que o PPT é um indicador de transferência de imunidade passiva via colostro (Rodrigues, 2012), porém uma fração das PPTs, a albumina, não se alterou, mas ela é um importante indicador diagnóstico para outras doenças (Leal et al 2003). Ainda, a tendência de aumento da GGT, previamente a broncopneumonia, pode ser em virtude de uma maior síntese de proteína hepática, indicando um processo inflamatório que viria a ocorrer (Ganhein, 2003).

De acordo com o resultado de expressão gênica o acometimento por broncopneumonia se deu por falhas de manejo após o nascimento, e não esteve relacionado a condição metabólica e inflamatória destes animais no período pré-natal. No fígado, a maior expressão de IGF1 e GHR1A, evidencia a maturação de vias metabólicas, como a via da gliconeogênese, fundamental para o desenvolvimento de bezerros (Hammon et al 2012). Segundo Butler et al. (2003), quando ocorre diminuição da insulina plasmática, como em períodos de Balanço Energético Negativo (BEN), a expressão de GHR e IGF-1 é diminuída. Jacometo (2015), encontrou aumento da expressão de GHR e IGF-1 no fígado de bezerros ao longo do tempo, em filhos de mães que receberam suplementação com aminoácidos e energia na dieta, porém não observou efeito da dieta. Já os marcadores inflamatórios, NFKB1 e SOD2, tem uma maior expressão quando a resposta imune está ativada (Osório, 2014a), sendo

que a suplementação com aminoácidos protegidos no rúmen de vacas durante o período de transição, aumentaram a expressão desses marcadores (Osorio et al., 2014a). Jacometo (2015) encontrou maior expressão de SOD2 a nível hepático e uma tendência a maior expressão de NFkB1 em bezerros cujas mães receberam suplementação com metionina no período de transição. Já uma menor expressão de STAT-3 em animais sinaliza alta susceptibilidade ao choque endotóxico e maior produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 e IFN- γ (Takeda et al 1999). Como não houve diferença entre a expressão de animais que tiveram posteriormente broncopneumonia ou não, podemos constatar que a ocorrência da doença não se deu por fatores metabólicos ligados ao desenvolvimento fetal, e sim por questões de ambiente e manejo.

Os animais sadios e doentes não apresentaram diferenças no desenvolvimento corporal durante o período experimental. Porém, é sabido que animais doentes utilizam seus nutrientes para à sua sobrevivência, em vez de utiliza-los para o desenvolvimento corporal (Gifford et al., 2012). Em relação ao sistema de criação, não houve diferença entre abrigos individuais e estacas. Os abrigos promovem redução da disseminação de doenças, porém há um aumento da pressão de infecção, sendo que criações mistas são mais propícios para aumento de incidência de afecções respiratórias (Gonçalves et al, 2000). A criação em estacas ao ar livre facilita o manejo e identificação de broncopneumonia rapidamente, porém, os bezerros estão sujeitos a intempéries climáticas (Muller et al, 2011; Nordlund et al, 2008).

CONCLUSÃO

Os níveis séricos de paraoxonase mostraram ser um importante marcador precoce no diagnóstico de broncopneumonia em bezerras. A expressão de genes ligados ao metabolismo e perfil inflamatório pré-natal não tiveram relação com a ocorrência de doença neste estudo, indicando que as causas de broncopneumonia foram fatores ligados ao manejo e imunidade dos neonatos após o nascimento. Ainda, parâmetros zootécnicos não tiveram interferência da doença e nem do sistema de criação.

REFERENCIAS

AKIRA, Shizuo; et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

BARRINGTON, G. M.; et al. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 7-34, 2002.

BIONAZ, Massimo et al. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR research**, v. 2013.2013.

BIONAZ, MASSIMO 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.

BORGES A.S et al. 1997. Avaliação da eficácia da administração de plasma, por via intravenosa, como tratamento da falência de transferência de imunidade passiva em bezerros da raça Holandesa. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 100p.

BROWNE, Richard 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.

BUTLER ST, et al. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal Endocrinol.**176: 205-217.

COLLA, MF et al. Valor da haptoglobina no plasma comparado com a contagem de células somáticas do leite no diagnóstico da mastite subclínica em vacas leiteiras. 2009. 67 f. Diss. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CONNELL, G. F.; SMITHIES, et al. Human Haptoglobins: Estimation and Purification. **Biochemical Journal**. V. 72, p. 115-121, 1959.

CRAY, C et al. Acute phase proteins in animals. Prog. Mol.Bio. Transl. **Science**, v.105, p.113-150, 2012.

do Rêgo LEAL¹, Marta Lizandra, et al. "Proteinograma sérico de bezerras saudáveis, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento." **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science** 40 (2003): 2.

FARID, Ayman Samir et al. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 73, 2013.

GANHEIM, C.; et al. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or Mannheimia haemolytica. **Journal Veterinary Medicine**, v.50, p.183-190, 2003.

GIFFORD C. A., et al 2012. Impacts of inflammation on cattle growth and carcass merit. **Journal Animal Science** 90:1438-1451.

GONÇALVES R.C., et al 2000. Aspectos clínicos e epidemiológicos da broncopneumonia dos bezerros em Botucatu, SP. **Revista Brasileira Ciência Veterinária** 7:144-147.

GONÇALVES, R.C.; et al. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Ciência Rural**, v.31, p.263-269, 2001.

GONÇALVES, Roberto C. et al. Influence of vitamin E on prophylaxis and treatment of moderate and severe bronchopneumonia in calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 127-135, 2011.

GONZÁLEZ, F.H.D.; et al. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anal. Vet. Mur*, v.23, p.5-17, 2007.

HAMMON, H. M. et al. Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: endocrine changes and responses to milk-borne and systemic hormones. **Domestic animal endocrinology**, v. 43, n. 2, p. 171-185, 2012.

IDOATE, I., et al. (2015). Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. **Veterinary immunology and immunopathology**, 163(3), 221-226.

JACOMETO, Carolina Bespalhock et al. Tese de doutorado. PPGBIOTEC UFPel. Nutrição materna: Efeitos no metabolismo e programação imunometabólica de neonatos bovinos, 2015.

JAIN, S.; et al. Acute phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm. Bioal. Sci.* v.3, p.118-127. 2011.

KRAUSE, Ana Rita 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.

LOHAKARE, J. D. et al. Effects of limited concentrate feeding on growth and blood and serum variables, and on nutrient digestibility and gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in dairy calves. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 96, n. 1, p. 25-36, 2012.

LOPES, Marcos Aurélio; et al. Influência de diferentes índices zootécnicos na composição e evolução de rebanhos bovinos leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 446-453, 2009.

MASTERNAK, Michal M. et al. Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 8, p. 679-684, 2005.

MENDES, R. S et al 2012. Perfil leucocitário e eficácia clínica da enrofloxacin (fórmula BAIK9) em dose única no tratamento de cães com gastroenterite por Parvovírus. **Ciencia Veterinária RPCV**. 111:43-49.

MÜLLER, Mylene; et al. Efeito de diferentes instalações sobre o comportamento ingestivo de bezerros da raça holandesa. **Revista da 9ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa. Dom Pedrito, Urcamp**, p. p17, 2011.

MURATA. H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004.

National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

NORDLUND, Kenneth V et al. Practical considerations for ventilating calf barns in winter. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24,n.1, p. 41-54, 2008.

OSORIO JS, et al (2013) Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of dairy science** 96(10):6248–6263.

OSORIO JS, et al. (2014a). Smartamine M and MetaSmart supplementation during the peripartal period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. **Journal of dairy science**, 97(12), 7451-7464.

PETERSEN, H.H.; et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

RADCLIFF, R.P., et al. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3933-3940, 2003.

REIS, G.L.; et al. 2008. Predição de peso vivo a partir de medidas corporais em animais mestiços Holandês/Gir. **Ciencia Rural**. 38(3):778-783.

RUBIO, Camila Peres; et al. Proteínas de fase aguda em cães: Possíveis aplicações em cirurgia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 4, p. 492-502, 2015.

RUSSELL, Karen E.; ROUSSEL, Allen J et al. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403-426, 2007.

SEPPÄ-LASSILA, Leena et al. Intestinal pathogens, diarrhoea and acute phase proteins in naturally infected dairy calves. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 41, p. 10-16, 2015.

SCHNEIDER, A. et al. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 269-271, 2013.

SCHNEIDER, Augusto et al. Insulin-like growth factor and growth hormone receptor in postpartum lactating beef cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 8, p. 925-931, 2010.

SNOWDER G.D., et al. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. **Journal of dairy science** 84:1999-2008.

TAKEDA, Kiyoshi et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 39-49, 1999.

UETAKE, K et al. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 101-105, 2013.

YUMET, G.; et al. Hepatic growth hormone resistance during sepsis is associated with increased suppressors of cytokine signaling expression and impaired growth hormone signaling. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 1420-1427, 2006.

7. Conclusão geral

Os níveis séricos de paraoxonase mostraram ser um importante marcador precoce no diagnóstico de diarreia e broncopneumonia em bezerras, porém a haptoglobina necessita de mais estudos para determinar se pode ser utilizado com esta finalidade. A expressão de genes ligados ao metabolismo e perfil inflamatório pré-natal não tiveram relação com a ocorrência de doenças neste estudo, indicando que as causas de diarreia e broncopneumonia foram fatores ligados ao manejo e imunidade dos neonatos após o nascimento. Também, parâmetros zootécnicos não tiveram interferência das doenças e nem dos sistemas de criação. No tratamento de diarreia, a solução de reposição oral auxiliou na resposta à antibioticoterapia, por determinar um proteinograma condizente com uma resposta inflamatória mais efetiva, demonstrando uma manutenção dos níveis protéicos, além de apresentar um perfil eletrolítico semelhante a animais saudáveis, enquanto a fluidoterapia endovenosa melhorou a condição clínica de animais com diarreia por manter a volemia e os parâmetros protéicos semelhantes a animais saudáveis. Nosso estudo foi eficaz quanto a determinação de preditores diagnósticos e avaliação de eficácia terapêutica para doenças em neonatos.

8. Referências

BARRINGTON, G M et al. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 7-34, 2002.

BELLINAZZI, Jessyca Beraldi et al. Effects of the stress of orchectomy on bronchoalveolar cytology of Holstein Calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 93-98, 2013.

BENESI, Fernando J. et al. Cytology of tracheobronchial and bronchoalveolar lavage in healthy Holsteins calves during the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 267-270, 2012.

CAMPOS, A. T., et al. Análise térmica de abrigos individuais moveis e sombrite para bezerros. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.27, n.1, p. 153-161, 2005.

CLIMENI, Bruno Santi Orsi et al. Qualidade do colostro bovino. **Revista Cient. Eletrônica Medicina Veterinária**, v. 10, p. 1-5, 2008.

COELHO S.G.; CARVALHO, A.U et al. Criação de animais jovens. In: NEIVA A.C.G.R., NEIVA, J.N.M. (Eds.). Do campus para o campo Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2006.

CONSTABLE, P. D., et al. 1996. Visna-like disease in a ram with chronic Demyelinatingencephalitis. **Journal Animal Veterinary Medicine Association**. 208:117-120.

CRAY, C et al. Acute phase proteins in animals. *Prog. Mol. Bio. Transl. Science*, v.105, p.113-150, 2012.

FREITAS, Moisés Dias et al. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. *Ciência Rural*, v. 40, n. 12, p. 2608-2615, 2010.

GANHEIM, C., et al. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *Journal Veterinary Medicine*, v.50, p.183-190, 2003.

GARCIA, Paulo Rogério et al. Sistema de avaliação do bem-estar animal para propriedades leiteiras com sistema de pastejo. 2013. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz.

GONÇALVES, R.C.; et al. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. *Ciência Rural*, v.31, p.263-269, 2001.

GONÇALVES, Roberto C. et al. Influência da suplementação de vitamina E na profilaxia e tratamento da broncopneumonia moderada e grave em bezerros¹. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 2, p. 127-135, 2011.

GONZÁLEZ, F.H.D.; et al. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anal. Vet. Mur.*, v.23, p.5-17, 2007.

GRAHAM, T.W.; et al. Biological markers of neonatal calf performance: the relationship of insulin-like growth factor-I, zinc, and copper to poor neonatal growth. *Journal of Animal Science*, v. 88, p. 2585-2593, 2010.

HULTÉN, C.; et al. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobins markers of treatment efficacy in pigsexperimentally infected with *Actinobacilluspleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 75–89, 2003.

IBGE, Instituto Brasileiro de geografia e estatística. Março de 2015. http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publicacao_completa.pdf data de acesso 08/01/2016.

IDOATE, I et al. (2015). Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. **Veterinary immunology and immunopathology**, 163(3), 221-226.

JAIN, S.; et al. Acute phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm. Bioal. Science.*, v.3, p.118-127. 2011.

KANEENE, J. B.; et al. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, p. 127-140, 1990.

KRAUSE, Ana Rita 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.

LOHAKARE, J. D. et al. Effects of limited concentrate feeding on growth and blood and serum variables, and on nutrient digestibility and gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in dairy calves. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 96, n. 1, p. 25-36, 2012.

LOPES, Marcos Aurélio, et al. Influência de diferentes índices zootécnicos na composição e evolução de rebanhos bovinos leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 446-453, 2009.

LORENZ, I.; VOGT, S et al. Investigations on the Association of D-lactate Blood Concentrations with the Outcome of Therapy of Acidosis, and with Posture and Demeanour in Young Calves with Diarrhoea. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, n. 9, p. 490-494, 2006.

MCGUIRK, Sheila M.; COLLINS, Michael et al. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 593-603, 2004.

MORTEO, C. G; et al. Estudio etiológico de los problemas diarreicos em becerros lactentes. **Veterinaria Mexicana**, v. 21, n. 4, p.435-438, 1990.

MOTA R.A., et al. 2000. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarréias em bezerros e leitões. **Hora Veterinária, Porto Alegre**, 118:21-24, 2000.

MOTTA, Rodrigo G. et al. Indicators of quality and composition of informal milk marketed in the in the Southeast region of São Paulo, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 417-423, 2015.

MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004.

NAYLOR, J.M., et al. Advances in oral and intravenous fluid therapy of calves with gastrointestinal disease. In: **World Buiatrics Congress**, 24., Nice, Paris. p.139-150, 2006.

ORRO, T. ; et al. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 182-187, 2008.

OSORIO JS, et al (2013) Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of Dairy Science** 96(10):6248–6263.

PETERSEN, H.H.; et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

RADOSTITIS, O.M. et al. **Veterinary medicine**. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10.ed. London: Saunders, 2007. 2065p.

RUSSELL, Karen E.; ROUSSEL, Allen J et al. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403-426, 2007.

SANTOS, Ferlando Lima et al. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2001.

SCHNEIDER, Augusto et al. Insulin-like growth factor and growth hormone receptor in postpartum lactating beef cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 8, p. 925-931, 2010.

SKINNER, J. G et al. International standardization of acute phase proteins. Special Report. **VeterinaryClinicalPathology**. v. 30, n. 1, p. 02-07, 2001.

SNOWDER, G. D. 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.

UETAKE, K et al. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 101-105, 2013.

WINDEYER, M. C. 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.

YUMET, G.; et al. Hepatic growth hormone resistance during sepsis is associated with increased suppressors of cytokine signaling expression and impaired growth hormone signaling. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 1420-1427, 2006.