

Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfa-tocoferol) no metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*)

Influence of age and vitamin E supplementation (DL-alpha-tocopherol acetate) on neutrophil oxidative metabolism in Holstein friesan (*Bos taurus*)

Joselito Nunes COSTA¹;
Ana Paula Cardoso
PEIXOTO²;
Aguemi KOHAYAGAWA³;
Anna Fernanda Machado
Sales da Cruz FERREIRA¹;
Maria Luiza CASSETARI⁴;
Adalberto José CROCCI⁵

1- Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA
2- Instituto de Ciências de Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA
3- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP
4- Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP
5- Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo analisar a influência do desenvolvimento etário e da suplementação com acetato de DL-alfa-tocoferol sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, em bovinos da raça holandesa, no período do nascimento até os 150 dias de idade. Foram utilizados 20 bezerros divididos em dois grupos de dez animais. Os animais do grupo Tratamento receberam 2000UI de acetato de DL-alfa-tocoferol, por via intramuscular, ao nascimento, aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias de idade, sendo o outro o grupo Controle, que não recebeu qualquer suplementação. Em ambos os grupos, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos demonstrou pouca atividade durante os primeiros 60 dias de vida, sendo indicativo da ineficiência deste importante mecanismo bactericida. Não foi observado efeito significativo da administração do acetato de DL-alfa-tocoferol sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.

Palavras-chave:
Neutrófilos.
Vitamina E.
Bovinos.

Correspondência para:
JOSELITO NUNES COSTA
Fazenda Experimental Oliveira dos
Campinhos
Escola de Medicina Veterinária
Universidade Federal da Bahia
44.215-000 - Santo Amaro - BA
ufbacdp@ufba.br

Recebido para publicação: 29/08/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Introdução

O sistema imunológico de bezerros encontra-se completamente desenvolvido ao nascimento, mas só funcionará eficientemente depois de algumas semanas de vida. A elevada incidência de doenças nesse período é atribuída às particularidades do sistema imunológico desses animais, relacionadas especialmente com a necessidade de ingestão de imunoglobulinas colostrais para obtenção de resistência no início da vida.¹ Nos

primeiros dez dias de vida, os bezerros possuem um número total de neutrófilos maior do que os adultos, mas o seu funcionamento não é completo até os 150 dias de idade.² Isto não quer dizer que os bezerros não possam responder aos antígenos, porém a resposta será fraca, lenta e facilmente revertida, originando a moderação da doença, mas, não prevenindo, no entanto, a ocorrência da infecção.³

A atividade bactericida dos neutrófilos envolve dois eventos celulares: a

explosão respiratória, iniciada pela ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), e a degranulação. A enzima NADP oxidase, depois de ativada, localiza-se na membrana plasmática, incorporando-se dentro do vacúolo fagocítico, catalisando a redução do oxigênio molecular (O_2) em superóxido aniônico⁴, o qual é fundamental para atividade bactericida neutrofílica. Esta atividade pode ser mensurada pela redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT)⁵. Hauser, Koob and James et al.² investigaram a influência do desenvolvimento etário sobre a função dos neutrófilos em bezerros, e registraram que a redução de NBT foi muito baixa nos animais com quatro a cinco semanas de idade. Já Woldehiwet and Rowan⁶, compararam a eficiência na fagocitose e ação bactericida contra *Staphylococcus aureus*, e concluíram que os neutrófilos provenientes de animais com 42 a 56 dias de idade foram significativamente menos eficientes na fagocitose e ação bactericida do que os de bezerros ao nascimento, aos 14, 28, 78 e 84 dias de idade.

A vitamina E é capaz de quelar formas reativas de oxigênio, diminuindo a formação de peróxidos, já que muitas dessas moléculas são auto-tóxicas, e podem destruir neutrófilos e macrófagos. Dessa forma essa vitamina protege a membrana lipídica, receptores e outros componentes celulares envolvidos na modulação da resposta imunológica.⁷ Hidiroglou et al.⁸ analisaram a produção de peróxido de hidrogênio e superóxido aniônico pelos neutrófilos de vacas suplementadas com 1000 UI de tocoferol/VO/dia, desde o período seco até o parto, não encontrando indícios que essa administração tenha aumentado a liberação desses compostos. Boxer⁹ avaliou a função de neutrófilos tratados com vitamina E “*in vitro*”, observando aumento da habilidade fagocítica, indicando que o decréscimo da produção do peróxido de hidrogênio dos neutrófilos tratados resultaria em menos danos oxidativos aumentando a eficiência da fagocitose; porém, por outro

lado, essa redução diminuiria a ação microbicida.

Nidiweni and Finch¹⁰ demonstraram que a suplementação com alfa-tocoferol e selênio aumentou significativamente a quimiotaxia, a migração e a fagocitose dos neutrófilos de bovinos contra *Staphylococcus aureus*, não sendo observada a elevação significativa dos níveis de superóxido aniônico. Eicher et al.¹¹ observaram aumento da atividade bactericida dos neutrófilos de bezerros suplementados, por três semanas, com alto teor de vitamina E (57 UI/Kg), quando comparados a outros que receberam baixa dose dessa vitamina (11,2 UI/Kg).

Em diversos experimentos, bezerros foram suplementados com vitamina E, por via oral e/ou parenteral; entretanto os resultados não foram conclusivos em relação à dose ou à via utilizada para a estimulação da resposta imunológica dos bovinos. Portanto este trabalho teve por objetivo, avaliar a influência do desenvolvimento etário e da suplementação com o acetato de DL-alfa-tocoferol sobre a função dos neutrófilos (metabolismo oxidativo) de bovinos da raça Holandesa desde o nascimento até os 150 dias de idade.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 20 bezerros da raça Holandesa que, após verificação prévia do estado de saúde (exame clínico, hemograma e parasitológico de fezes), foram acompanhados do nascimento até os 150 dias de idade. Após o nascimento realizou-se a desinfecção do umbigo, foi fornecido quatro litros de colostro, e os animais alocados em baias individuais. Os bezerros continuaram a receber quatro litros de um “pool” de colostro por mais dois dias, quando então começaram a receber, em baldes, quatro litros de leite por dia, feno e ração granulada “*ad libitum*”. Após 90 dias de idade, foram transferidos para piquetes coletivos, e começaram a receber, ração peletizada, feno de alfafa, silagem de milho, além de sal mineral e água.

Os 20 bezerros ao nascimento foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos de dez animais, sendo um o controle e o outro o tratamento. Os bezerros do grupo tratamento receberam 2 g (2000 UI) de acetato de DL-alfa-tocoferol (Monovin E, Bravet), por via intramuscular, ao nascimento e aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias de idade. O Grupo Controle não recebeu nenhuma suplementação para esta vitamina.

Foram colhidas amostras de sangue total, com EDTA, para realização de hemograma e verificação do estado de saúde do animal, e sem EDTA, para retirar alíquota a ser utilizada, após adição de heparina, no teste da função dos neutrófilos e para retirada de soro sanguíneo, usado na determinação da vitamina E ao nascimento e aos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de idade. Para avaliar os fatores de variabilidade relacionados com o desenvolvimento etário sobre a função dos neutrófilos foram utilizados os animais do grupo Controle, enquanto que para observar os efeitos da suplementação com vitamina E, sobre os parâmetros analisados, os valores obtidos nos animais do Grupo Tratado foram comparados com aqueles obtidos nos animais do Grupo Controle.

Foram colhidos 5 mL de sangue mediante punção da veia jugular, utilizando-se agulhas descartáveis (25X8) acopladas em tubos estéreis à vácuo (vacutainer - vacuum II, Labnew), com anticoagulante, para realização do hemograma, e sem anticoagulante para a realização do teste da redução do Nitroblue Tetrazolium (NBT), para avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, sendo este teste um método microscópico de Park and Good⁵, modificado por Ciarlini et al.¹². Uma alíquota de 500 µL do sangue sem anticoagulante era transferida para um ependorf estéril, recebendo 2 µL de heparina. O NBT se baseia na adição de um reagente de cor a amostras de sangue heparinizado, no caso do teste não estimulado. No teste estimulado além do corante, é adicionado extrato liofilizado de bactérias, simulando *in vitro* uma

infecção bacteriana. Os testes da redução não estimulada do NBT (NBT-NE) e estimulada (NBT-E) foram realizados simultaneamente, antes de transcorridas duas horas após a colheita do sangue, sendo o resultado observado através da leitura, em microscópio, de esfregaços sanguíneos. A dosagem sérica da vitamina E foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).¹³

Os resultados foram analisados através de valores medianos, dentro de cada grupo e de cada faixa etária. Considerando-se que os dois grupos de animais (tratado e controle) foram avaliados ao longo do tempo (ao nascimento, aos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de idade), utilizou-se a análise de perfil (Morrison 1990) para cada variável avaliada no experimento. Foi utilizada ainda a análise estatística não paramétrica¹⁴, com a aplicação do teste de Friedman, para comparação de momentos em cada grupo e do teste de Mann-Whitney para comparação de grupos em cada momento. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Os valores medianos de vitamina E dos grupos controle e tratado, do nascimento aos 150 dias de idade, foram, respectivamente: Ao nascimento – 1,45mg/dl e 0,97mg/dl; aos 15 dias – 0,92 mg/dl e 1,42mg/dl; aos 30 dias – 0,97mg/dl e 0,89mg/dl; aos 60 dias 1,07mg/dl e 1,08mg/dl; aos 90 dias – 1,86mg/dl e 2,20mg/dl; aos 120 dias - 2,89mg/dl e 4,15mg/dl; e aos 150 dias – 2,89mg/dl e 5,64mg/dl. Estes resultados estão de acordo com as observações realizadas por Reddy et al.¹⁵, que utilizaram a suplementação por via oral e com Hidrioglou et al.¹⁶, que usou a via parenteral. A concentração sérica de vitamina E do soro sanguíneo do grupo tratado foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior que a dos animais do grupo Controle, aos 15, 90, 120 e 150 dias de idade,

demonstrando a eficiência da suplementação, utilizada neste trabalho, para elevar o teor sérico dessa vitamina.

Os valores medianos obtidos para o teste da função dos neutrófilos, expressos em % de células redutoras do NBT, prova não estimulada (NBT - NE) e estimulada (NBT - E), estão apresentados na tabela 1.

A redução do NBT no interior do granulócito indica a capacidade bactericida, sendo este teste útil para detectar anormalidades no metabolismo fagocítico oxidativo.¹⁷ Os menores valores de neutrófilos redutores do NBT, logo após o nascimento, foram verificados em bovinos recém-nascidos, persistindo até uma semana depois do parto, estando os mesmos relacionados com a diminuição da produção do superóxido aniônico.¹⁸

Neste experimento os valores medianos de neutrófilos na prova não estimulada (NBT - NE), foram muito baixos nos 30 primeiros dias de vida (1 a 5%), apresentando, a seguir, elevações significativas ($p \leq 0,05$).¹⁹

Estes resultados e a análise da literatura comprovam a incapacidade da resposta neutrofilica dos neonatos, tornando os bezerros altamente susceptíveis às infecções durante os primeiros dias de vida.³ Estes valores menores podem estar relacionados com a diminuição da produção do superóxido aniônico. Isto foi verificado em bovinos recém-nascidos, com persistência desse achado até uma semana depois do parto.¹⁸ Possíveis explicações para a falha do mecanismo de produção do superóxido aniônico incluem anormalidades na ativação do complexo enzimático NADPH - oxidase, déficit de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), atividade anormal ou deficiente da proteína C - kinase (PKC) e ainda diferenças no tamanho das células.²⁰

Neste experimento, o percentual médio de neutrófilos redutores do NBT, prova estimulada (NBT - E), apresentou o mesmo comportamento daquele observado para a prova não estimulada (NBT - NE), ou seja, demonstrando elevações

Tabela 1

Metabolismo oxidativo dos neutrófilos: valores medianos expressos em percentual (%) de células redutoras do NBT-prova não estimulada (NBT - NE) e prova estimulada (NBT - E), em bovinos da raça holandesa não tratados (controle) e tratados (tratamento), com acetato de DL-alfa-tocoferol, ao nascimento, aos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de idade

Idade (dias)	Controle (%)		Tratamento (%)	
	NBT - NE	NBT - E	NBT - NE	NBT - E
Ao nascimento	1,0 aA *	5,5 aA	1,0 aA	2,0 aA
15	3,5 aA	9,0 aA	2,5 aA	15,0 aB
30	5,5 aA	16,0 aA	3,5 aA	9,0 aB
60	9,0 aB	38,0 aB	13,0 aB	24,5 aC
90	11,0 aB	53,5 aB	20,0 aB	36,0 aC
120	14,0 aB	49,5 aB	8,5 aB	36,0 aC
150	10,0 aB	33,0 aB	14,0 aB	42,0 aC

* Letras minúsculas comparam grupos em cada momento; letras maiúsculas comparam momentos para cada grupo, letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$)

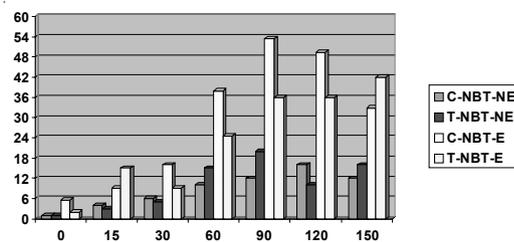


Figura 1

Metabolismo oxidativo dos neutrófilos: valores medianos expressos em percentual (%) de células redutoras do Nitroblue Tetrazolium (NBT) - Prova não estimulada (NBT-NE) e Prova estimulada (NBT-E), em bovinos da raça holandesa não tratados (controle) e tratados (Tratamento) com acetato de D-L-alfa-tocoferol ao nascimento e aos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de idade

significativas ($p \leq 0,05$) do percentual mediano de neutrófilos redutores, conforme avançava a idade. Entretanto, os valores obtidos na prova estimulada (NBT - E), foram maiores em todos os momentos estudados, estando estes resultados de acordo com Costa et al.²¹, que realizaram a prova estimulada também em bovinos. Esta prova foi idealizada por Park e Good⁵, objetivando descartar resultados falsos negativos, por avaliar a capacidade dos neutrófilos de reduzir o NBT, na presença de um extrato bacteriano. É esperado, portanto, que os valores obtidos para esta prova sejam sempre superiores aos obtidos na prova não

estimulada (NBT - NE), como foi observado nesta pesquisa.

O menor valor percentual de neutrófilos redutores do NBT, prova não estimulada (NBT - NE), em ambos os grupos, foi obtido ao nascimento (1%) e o maior percentual aos 90 dias de idade (20%). A análise dos resultados nos permite afirmar, que não houve influência significativa do tratamento com vitamina E nos valores obtidos, uma vez que estes não diferiram significativamente, daqueles encontrados para os animais do grupo Controle.

A ausência da influência da suplementação com vitamina E, na prova não estimulada, está de acordo com os resultados obtidos por Ndiweni e Finch¹⁰, que não observaram nem elevação nem diminuição da produção de superóxido aniônico nos neutrófilos de animais tratados com vitamina E. Apesar da igualdade dos resultados, com relação ao teste do NBT - NE, obtidos para os animais dos dois grupos experimentais, acredita-se que a função microbicida, as capacidades migratórias e fagocíticas dos neutrófilos sejam maiores nos animais do

grupo tratado com vitamina E, como foi observado por Politis et al.²². Este aumento da função dos neutrófilos tem uma relação direta com a elevação do teor de vitamina E nestas células. Discorda-se, entretanto, de Engle, Yoder e Yu²³ que verificaram um decréscimo da produção de superóxido aniônico pelos neutrófilos de animais suplementados com vitamina E e afirmaram que isto poderia levar a uma diminuição da capacidade microbicida, ou seja, o efeito inverso.

Com relação ao teste do NBT na prova estimulada (NBT - E) nos animais do grupo tratado com vitamina E (Tratamento), o menor percentual de neutrófilos redutores foi observado logo após o nascimento (2%) e o maior percentual aos 150 dias de idade (42%). A interpretação dos resultados, quando comparados os dois grupos, nos permite afirmar que não houve influência significativa ($p \leq 0,05$) do tratamento com acetato de DL-alfa-tocoferol, uma vez que os valores obtidos para os animais tratados (Tratamento), não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) daqueles obtidos para os animais do grupo Controle.

Abstract

This study was carried out to evaluate the influence of age and supplementation with acetate of DL-alpha-tocopherol on the neutrophils oxidative metabolism of Holstein calves from birth to 150 days of age. Twenty calves were divided in two groups of ten animals. The animals of group Treatment received 2000UI of DL-alpha-tocopherol acetate, IM, at birth, and at 15, 30, 60, 90 and 120 days of age. The other group (Control), did not receive any supplementation. In both experimental groups the neutrophils oxidative metabolism showed little activity during the first 60 days of life, which could indicate inefficiency of this important bactericidal mechanism. Neutrophils oxidative metabolism was not significantly affected by treatment with acetate of DL-alpha-tocopherol.

Key-words:

Neutrophils.
Vitamin E.
Bovine.

Referências

1. TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology: an introduction**. 6 ed. London: Saunders Company, 2000. 482 p.
2. HAUSER, M. A., KOOB, B. S., JAMES, A. R. Variation of neutrophil function with age in calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 152-153, 1986.
3. CORTESE, S. V. Neonatal Immunology. In: HOWARD, S. **Current veterinary therapy: food animal practice**. 4. ed. London: Saunders Company, 1999, p. 51-56.
4. MAUG, J. H. Singlet oxygen: A unique microbicidal agent in cells. **Science**, v. 182, p. 44, 1973.
5. PARK, B. H., GOOD, R. A. N.B.T. test stimulated. **Lancet**, v. 19, p. 616, 1970.
6. WOLDEHIWET, Z.; ROWAN, T. G. Some observations on the effects of age of calves on the

- phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leucocytes. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 146, p. 165-170, 1990.
7. MEYDANI, M. Vitamina E. **Lancet**, v. 345, p. 170-175, 1995.
 8. HIDIROGLOU, M. et al. Possibles roles of vitamin E in immune response of calves. **International Journal Vitamins Nutritional Research**, v. 62, p. 308-11, 1992.
 9. BOXER, L. A. Regulation of phagocyte by a-tocopherol. **Proceedings Nutrition Society**, v. 45, p. 333-344, 1986.
 10. NIDIWENI, N., FINCH, J. M. Effects of in vitro supplementation with a-tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions: implications for resistance **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 51, p. 67-68, 1996.
 11. EICHER, S. D. et al. Leukocyte functions of young dairy calves fed milk replacers supplemented with vitamin A and E. **Journal Dairy Science**, v. 77, p. 1399-1407, 1994.
 12. CIARLINI, P. C. et al. Leucograma, fibrinogênio plasmático e capacidade bactericida dos neutrófilos de éguas susceptíveis e resistentes à endometrites. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 123-126, 1997.
 13. ARNAUD, J. et. al. Simultaneous determination of retinol, a-tocopherol and b-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chromother**, v. 572, p.103-116, 1991.
 14. ZAR, J. H. Biostatistical analysis, Prentice-Hall. New Jersey. 718 p. 1996.
 15. REDDY, P. G., MORRIL, J. L., MINOCHA, H. C., STEVENSON, J. S. Vitamin E is immunostimulatory in calves. **Journal Dairy Science**, v.70, p.993-999, 1987.
 16. HIDIROGLOU, M.; BATRA, T.R.; ZHAO, X. Bioavailability of vitamin E compounds and effect of supplementation on release of superoxide and hydrogen peroxide by neutrophils. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 187-193, 1997.
 17. PIVA, E. et al. Neutrophil NADPH Oxidase activity in chronic myeloproliferative and myelodysplastic diseases by microscopic and photometric assays. **Acta Haematologicae**, v. 94, p. 16-22, 1995.
 18. DORÉ, M.; SLAUSON, D. O.; NEILSEN, N. R. Membrane NADPH Oxidase activity and cell size in bovine neonatal and adult neutrophils. **Pediatric Research**, v. 28, p. 327-331, 1990.
 19. LEE, E., KEHRLI, M. E. Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 59, p. 37-43, 1998.
 20. ARDATI, K. O., BAJAKIAN, K. M., TABBARA, K. Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on neutrophil function. **Acta Hematological**, v. 97, p. 211-215, 1997.
 21. COSTA, J. N. et al. Metabolismo oxidativo de neutrófilos de vacas da raça nelore (*Bos Indicus*). **Brazilian Journal Veterinary Science**, v. 7, p. 198, 2000. Suplemento
 22. POLITIS, I. et al. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, p. 179-84, 1995.
 23. ENGLE, W. A. YODER, M. C., YU, PAO-LO. Vitamin E decreases superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. **Pediatric Research**, v. 23, p. 245-248, 1988.