

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA NUTRIÇÃO ADEQUADA E INSUFICIENTE EM
COBRE OU ZINCO SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL À
VACINAÇÃO CONTRA *Clostridium chauvoei* E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS EM BEZERROS NELORE

HORRYS FRIAÇA SILVA

BOTUCATU – SP
AGOSTO 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA NUTRIÇÃO ADEQUADA E INSUFICIENTE EM
COBRE OU ZINCO SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL À
VACINAÇÃO CONTRA *Clostridium chauvoei* E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS EM BEZERROS NELORE

HORRYS FRIAÇA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof.Dr. João Pessoa Araújo Júnior
Co-Orientador: Prof.Dr. Márcio R. G. Kuchembuck

BOTUCATU – SP

Agosto 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Silva, Horrys Friaça.

Avaliação da nutrição adequada e insuficiente em cobre ou zinco sobre a resposta imune humoral à vacinação contra *Clostridium chauvoei* e parâmetros hematológicos em bezerros Nelore / Horrys Friaça Silva. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Assunto CAPES: 50501062

1. Bovino - Doenças 2. Bezerro - Doenças - Aspectos imunológicos

CDD 636.20896

Palavras-chave: Anticorpos; Bovinos; *Clostridium chauvoei*; Cobre; Zinco

Composição da banca examinadora:

Autor: Horrys Friaça Silva

Botucatu, 24 de agosto de 2006.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Prof. Adjunto Dr. Julio Naylor Lisboa

Prof. Adjunta Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

Prof. Dr. Alexandre Secorum Borges

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Composição das misturas minerais formuladas com base na análise de pastagem	17
QUADRO 2. Momentos de avaliação efetuados antes dos animais completarem seis meses de idade e receberem a primeira vacinação (M1 A M6)	19
QUADRO 3. Datas dos momentos de avaliação referentes à primeira vacinação: material coletado e análises correspondentes	20
QUADRO 4. Datas dos momentos de avaliação referentes à segunda vacinação: material coletado e análises correspondentes	20
QUADRO 5. Condições de operação do espectrômetro com configuração axial para as determinações dos minerais Cu e Zn	22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Médias e desvios padrões dos níveis hepáticos de cobre (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)	29
TABELA 2. Cobre hepático materno, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	29
TABELA 3. Médias e desvios padrões dos níveis hepáticos de zinco (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)	31
TABELA 4. Zinco hepático materno, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	31
TABELA 5. Médias e desvios padrões dos níveis hepáticos de cobre e zinco (ppm) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e aos 150 dias de idade (M6)	34
TABELA 6. Cobre e zinco hepático dos bezerros aos 150 dias de idade (M6), hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários	34
TABELA 7. Médias e desvios padrões dos níveis séricos de cobre (ppm) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 e M21)	36
TABELA 8. Cobre sérico dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	36
TABELA 9. Médias e desvios padrões dos níveis séricos de zinco (ppm) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 e M21)	38
TABELA 10. Zinco sérico bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	38
TABELA 11. Médias e desvios padrões da concentração de superóxido dismutase (SOD U/g Hb) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M1 a M6)	40
TABELA 12. Concentração de superóxido dismutase (SOD U/g Hb) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	40
TABELA 13. Médias e desvios padrões do índice ELISA para os anticorpos anti- <i>Clostridium chauvoei</i> (passivos) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M1 a M6)	42

TABELA 14. Índice ELISA para os Ac. anti- <i>Clostridium chauvoei</i> (passivos) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	42
TABELA 15. Médias e desvios padrões do índice ELISA para anticorpos anti- <i>Clostridium chauvoei</i> em resposta à vacinação dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	48
TABELA 16. Índice ELISA para os anticorpos anti- <i>Clostridium chauvoei</i> (vacina) dos bezerros, hipóteses, estatística e comentários (análise de perfil)	48
TABELA 17. Médias e desvios padrões do volume globular (%) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M0 a M7)	52
TABELA 18. Volume globular (%) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	52
TABELA 19. Médias e desvios padrões do volume globular (%) ao reforço vacinal dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	53
TABELA 20. Volume globular (%) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	53
TABELA 21. Médias e desvios padrões da concentração plasmática de proteína total (g/dL) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	54
TABELA 22. Concentração plasmática de proteína total (g/dL) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	54
TABELA 23. Médias e desvios padrões da concentração plasmática de proteína total (g/dL) ao reforço vacinal, de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	55
TABELA 24. Concentração plasmática de proteína total (g/dL) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	55
TABELA 25. Médias e desvios padrões da concentração de fibrinogênio (mg/dL) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	56
TABELA 26. Concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	56
TABELA 27. Médias e desvios padrões da concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	57

TABELA 28. Concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	57
TABELA 29. Médias e desvios padrões da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	58
TABELA 30. Concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	58
TABELA 31. Médias e desvios padrões da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal, de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	59
TABELA 32. Concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	59
TABELA 33. Médias e desvios padrões da concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	60
TABELA 34. Concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	60
TABELA 35. Médias e desvios padrões de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	61
TABELA 36. Concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	61
TABELA 37. Médias e desvios padrões da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	62
TABELA 38. Concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	62
TABELA 39. Médias e desvios padrões da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal, de bezerros Neloires sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	63
TABELA 40. Concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	63
TABELA 41. Médias e desvios padrões da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	64

TABELA 42. Concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	64
TABELA 43. Médias e desvios padrões da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M8 a M14)	65
TABELA 44. Concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	65
TABELA 45. Médias e desvios padrões da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	66
TABELA 46. Concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	66
TABELA 47. Médias e desvios padrões da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	67
TABELA 48. Concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	67
TABELA 49. Médias e desvios padrões da concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	68
TABELA 50. Concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	68
TABELA 51. Médias e desvios padrões de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros em diferentes tratamentos e momentos de avaliação	69
TABELA 52. Concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Gráfico das médias dos níveis hepáticos de cobre (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)	29
FIGURA 2. Representação gráfica das médias dos níveis hepáticos de zinco (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)	31
FIGURA 3 e 4. Representações gráficas das médias dos níveis hepáticos de cobre ou zinco (ppm) sob diferentes tratamentos aos 150 dias de idade (M6)	34
FIGURA 5. Representação gráfica das médias dos níveis séricos de cobre (ppm) dos bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 e M21)	36
FIGURA 6. Representação gráfica das médias dos níveis séricos de zinco (ppm) dos bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 a M21)	38
FIGURA 7. Representação gráfica da concentração de superóxido dismutase (SOD U/g Hb) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M1 a M6)	40
FIGURA 8. Representação gráfica das médias do índice ELISA para os anticorpos anti- <i>Clostridium chauvoei</i> (colostrais) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M0, M6, M7, M8 e M14)	42
FIGURA 9. Representação gráfica das médias do índice ELISA para os anticorpos anti- <i>Clostridium chauvoei</i> (vacina) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	48
FIGURA 10. Representação gráfica das médias do volume globular (%) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	52
FIGURA 11. Representação gráfica das médias do volume globular (%) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	53
FIGURA 12. Representação gráfica das médias da concentração sérica de proteína total (g/dL) de bezerros Neloires sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	54
FIGURA 13. Representação gráfica das médias da concentração sérica de proteína plasmática total (g/dL) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	55

FIGURA 14. Representação gráfica das médias da concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	56
FIGURA 15. Representação gráfica das médias da concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	57
FIGURA 16. Representação gráfica das médias da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	58
FIGURA 17. Representação gráfica das médias da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	59
FIGURA 18. Representação gráfica das médias da concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	60
FIGURA 19. Representação gráfica das médias de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	61
FIGURA 20. Representação gráfica das médias da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação	62
FIGURA 21. Representação gráfica das médias da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M8 a M14)	63
FIGURA 22. Representação gráfica das médias da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	64
FIGURA 23. Representação gráfica das médias da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	65
FIGURA 24. Representação gráfica das médias da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)	66
FIGURA 25. Representação gráfica das médias da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)	67

FIGURA 26. Representação gráfica das médias de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14) 68

FIGURA 27. Representação gráfica das médias da concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21) 69

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1) Cobre e zinco.....	1
1.2) Cobre e zinco e resposta imune.....	6
1.3) <i>Clostridium chauvoei</i>	12
2) OBJETIVOS.....	15
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1) Animais e características dos grupos experimentais.....	16
3.2) Suplementação mineral.....	16
3.3) Controle sanitário do rebanho.....	17
3.4) Colheita de amostras de fêmeas adultas.....	17
3.5) Vacinação dos bezerros.....	18
3.6) Acompanhamento dos bezerros e colheita de material.....	18
3.7) Processamento do material obtido.....	20
3.8) Análise dos resultados.....	26
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1) Níveis hepáticos de cobre nas matrizes.....	27
4.2) Níveis hepáticos de zinco nas matrizes.....	30
4.3) Níveis hepáticos de cobre e zinco nos bezerros.....	32
4.4) Níveis séricos de cobre nos bezerros.....	35
4.5) Níveis séricos de zinco nos bezerros.....	37
4.6) Superóxido-dismutase.....	39
4.7) Índice ELISA de anticorpos anti- <i>C.chauvoei</i> (passivos/colostrais).....	41
4.8) Índice ELISA de anticorpos anti- <i>C.chauvoei</i> (vacina).....	43
4.9) Hemograma.....	49
5) CONCLUSÕES.....	70
6) BIBLIOGRAFIA.....	71
8) TRABALHO CIENTÍFICO.....	79

RESUMO

Autor: Horrys Friaça Silva. **Título:** Avaliação da nutrição adequada e insuficiente em cobre ou zinco sobre a resposta imune humoral à vacinação contra *Clostridium chauvoei* e parâmetros hematológicos em bezerros Nelore. Botucatu-SP, 2006, 108p., Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-UNESP/Botucatu: Avaliou-se o efeito de níveis nutricionais adequados ou insuficientes em cobre (Cu) ou zinco (Zn) sobre a resposta imune humoral e hemograma de bezerros Nelore, submetidos à vacinação contra *Clostridium chauvoei*. O grupo Controle (n=10) foi composto por bezerros cujas mães receberam nutrição mineral adequada. O grupo -Zn (n=10), e o -Cu (n=10) foram formados por bezerros nascidos de vacas mantidas em dieta insuficiente em Zn e Cu respectivamente. Estes bezerros foram acompanhados até os seis meses de idade, recebendo a mesma suplementação mineral de suas mães. Nestes primeiros seis meses de vida foram medidos os títulos de anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* recebidos via colostro e os níveis de superóxido dismutase eritrocitária. Aos 150 dias de vida estes bezerros tiveram fragmentos de tecido hepático colhidos para análise de Cu e Zn. Aos 180 dias de vida os bezerros receberam vacina contra *Clostridium chauvoei*, e 36 dias após, receberam reforço vacinal. Foram então medidos os níveis séricos de Cu e Zn (três momentos), títulos de anticorpos em resposta à vacinação (cinco momentos) e hemograma (14 momentos). Apesar de não terem sido obtidos níveis hepáticos de Cu indicativos de deficiência, foram observadas diferenças significativas destes níveis de Cu entre os três grupos (-Zn>Controle>-Cu). Tais diferenças se refletiram em diferenças significativas entre os títulos de anticorpos (Controle>-Zn>-Cu aos 21 dias após a vacinação e 15 dias após o reforço) e algumas variáveis do hemograma dos diferentes grupos, durante os momentos relacionados ao reforço vacinal (volume globular, leucócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos).

ABSTRACT:

Author: Horrys Friaça Silva. **Title:** Evaluation of copper or zinc adequate or insufficient nutrition on the humoral immune response to *Clostridium chauvoei* and haematological parameters of Nelore calves. Botucatu-SP, 2006, 108p., Doctorate, *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-UNESP/Botucatu*: This research aims to assess the effects of copper and zinc insufficient nutritional levels on the humoral immune response of Nelore calves, submitted to *Clostridium chauvoei* vaccination. The Control Group (n=10) was composed of calves whose mothers received adequate mineral nutrition. The calves of Group -Zn (n=10) and Group -Cu (n=10) were born, respectively, from cows under insufficient Zn or Cu nutrition. These calves were accompanied until six months of life, having access to the same mineral supplementation of their mothers. In these calves' first six months of life the titers of anti-*Clostridium chauvoei* antibodies, received *via* colostrums, were measured by ELISA assay. At 150 days old, these calves had fragments of their hepatic tissue collected for Cu and Zn levels analysis. At 180 days old, the calves received the first dose of *Clostridium chauvoei* vaccine. A second dose of this vaccine was given 36 days later. Then, the antibodies titers in response to both vaccination (five sampling times), the serum Cu and Zn levels (three sampling times) and hemogram were also measured (14 sampling times). Although Cu hepatic levels compatible with deficiency were not obtained, significant differences among these Cu levels of the three groups of calves were observed (-Zn>Control>-Cu), as well as significant differences among the antibodies titers (Control>-Zn and -Cu at 21 days after the first vaccine dose and Control>-Zn>-Cu at 15 days after the booster vaccination) and hemogram of the different groups at the sampling times related to the booster vaccination (corpuscular volume, leucocytes, neutrophils, monocytes and eosynophils).

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1) Cobre e Zinco

Desequilíbrios minerais nos solos e pastagens têm sido responsáveis por baixa produtividade em ruminantes criados sob pastejo em extensas áreas do planeta. Muitas vezes tal efeito acaba ocorrendo a despeito da presença de suprimentos forrageiros abundantes. O fornecimento adequado de minerais é fundamental para aumentar os índices de produtividade dos rebanhos e dentre as deficiências nutricionais, a mais fácil de ser corrigida, a um custo relativamente baixo, é a de minerais (McDOWELL, 1999).

O cobre (Cu) e o zinco (Zn), são microelementos minerais considerados essenciais para as espécies domésticas. O Cu funciona como componente essencial de inúmeras enzimas, incluindo lisil-oxidase (tecido conjuntivo), Cu-Zn-superóxido-dismutase (antioxidante), citocromo-oxidase (metabolismo energético), ceruloplasmina (transporte de ferro, antioxidante) e tirosinase (melanina) e por isto, está envolvido em diversos processos metabólicos, podendo a hipocuprose afetar todos os estágios de crescimento e produção (NRC, 1996; SUTTLE, 1986).

A função primária do Zn no organismo está relacionada ao seu envolvimento com os processos enzimáticos, ora como componente molecular, ora como ativador. Está envolvido no metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. O Zn interage biologicamente com a produção, armazenamento e secreção de hormônios individuais (insulina, testosterona e adrenocorticoídes), bem como na integridade da resposta de órgãos efetores (McDOWELL, 1999). O zinco é um cofator de pelo menos 90 metaloenzimas, incluindo aquelas envolvidas na estabilização de DNA e transcrição de RNA. Dessa maneira a deficiência marginal de zinco pode afetar os sinais reguladores e a expressão de genes. A deficiência deste elemento afeta predominantemente células que estão em constante proliferação e diferenciação, como as células do sistema imune e reprodutor (MYRVIK, 1994; KEUSCH, 1994).

O Cu e o Zn são componentes da metaloenzima Cu-Zn-superóxido-dismutase (Cu-Zn-SOD), que exerce atividade antioxidante no metabolismo celular e são elementos considerados essenciais para o bom funcionamento do sistema imunológico e das funções reprodutivas dos bovinos (GRAHAM, 1991).

A deficiência de cobre foi apontada como a mais comum entre as deficiências de microminerais encontradas em bovinos por todo o planeta (McDOWELL, 1999).

Tokarnia et al. (1999), em artigo de revisão sobre os estudos realizados no período de 1987 até 1998 a respeito de deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos no Brasil, apontaram as deficiências de cobre e de cobalto como as mais freqüentes. A deficiência de zinco também foi verificada com freqüência elevada no período abrangido pela revisão. Destacaram-se por outro lado, os valores acentuados de ferro encontrados em diversas regiões. Em algumas delas, foi demonstrado que os altos níveis de ferro estavam associados aos baixos valores de cobre. Moraes et al. (1994) observaram a existência de níveis de zinco abaixo dos requerimentos mínimos dos bovinos em 42% das pastagens avaliadas no Brasil.

Os requerimentos diários de Cu para bovinos de corte, em suas diversas faixas etárias, foram estimados em 10 mg/kg, em bases de matéria seca (ppm), pelo *National Research Council* norte-americano (NRC, 1996). Segundo Marston (1999), estes requisitos devem apresentar certa variabilidade, relativa ao metabolismo das diversas raças bovinas e sistemas de exploração. Outro fator a ser considerado é a interação com outros elementos, afetando a biodisponibilidade do cobre. Os elementos que freqüentemente interagem com o Cu são: molibdênio (Mo), ferro (Fe), enxofre (S) e zinco (Zn). Outros como cálcio (Ca), cobalto (Co), manganês (Mn), fósforo (P) e selênio (Se), também demonstram interação, porém em menor grau.

Os requerimentos de Cu, geralmente se elevam quando da presença de níveis relativamente elevados de Mo e S. O efeito antagonista do Mo sobre o metabolismo do Cu é exacerbado pela presença de S. Estes elementos interagem nas condições próprias do rúmen e formam “tiomolibdatos”. Quando formados, estes complexos são pouco absorvidos. Porém, a pequena quantidade que atinge a circulação sangüínea afeta sistematicamente o metabolismo do Cu, fazendo com que ele se ligue à albumina plasmática e torne-se indisponível para as reações bioquímicas. Assim, inibe diretamente a produção de metaloenzimas dependentes de Cu. Por esta razão, observa-se em bovinos com deficiência de Cu secundária ao excesso de Mo e S, um comprometimento mais acentuado das funções do sistema imune (COUSINS, 1985; SUTTLE, 1986). No Brasil o

problema está mais ligado ao excesso de Fe nos solos e pastagens do que ao Mo e S (TOKARNIA et al., 1999).

Marston (1999) propõe que para cada ppm de Mo na dieta, ocorre uma diminuição da biodisponibilidade do Cu avaliada em 8 ppm. Assim se uma ração contiver 1ppm de Mo e 20 ppm de Cu, o gado só poderá contar efetivamente com 12 ppm.

Para McDowell (1999) uma dieta total contendo seis ppm de Cu e 1,5 ppm de Mo, seria apropriada, na maioria dos casos para bovinos de corte. Para valores inferiores a 1,5 ppm de Mo, níveis de até quatro ppm de Cu poderiam ser suficientes.

O NRC (1996), estabelece 30 mg/kg de Zn, em bases de matéria seca (ppm), como nível nutricional diário adequado para gado de corte em todas as categorias. McDowell (1999) sugere valores entre 20 e 40 ppm de Zn em bases de matéria seca na dieta total diária.

Outros fatores além da ingestão do mineral interferem na manifestação da deficiência de Zn. Menard e Cousins (1983) demonstraram em ratos o aumento da absorção de Zn em períodos de restrição da ingestão deste mineral. Houve aumento da expressão da proteína transportadora do elemento, em preparado de células intestinais dos animais deficientes, em relação ao grupo controle. Segundo os autores, tal efeito pode ocorrer durante períodos de maior demanda como a gestação e a lactação.

O desenvolvimento do feto requer alta demanda de nutrientes oriundos de fontes maternas (XIN et al., 1993). O feto acumula Cu no fígado às expensas de sua mãe, via transferência placentária. A concentração de Cu se eleva no fígado fetal com o tempo de gestação, sendo que no gado deficiente em Cu ocorrerá um declínio nos níveis hepáticos fetais após seis meses de gestação. No gado alimentado adequadamente, o feto acumulará Cu crescentemente, até o final da gestação, para alcançar as necessidades do período pós-natal. A magnitude da deficiência de Cu em certas áreas ressalta a importância da adequada suplementação deste elemento em fêmeas prenhes, visto que a nutrição materna adequada é essencial para o desenvolvimento do feto e também para saúde e crescimento pós-natal (SMART et al., 1983).

Gengelbach et al. (1997) avaliaram a concentração tecidual de cobre, em bezerros nascidos de mães submetidas a diferentes níveis nutricionais de Cu, Fe

e Mo durante a gestação. Nas novilhas não suplementadas com Cu, a gestação contribuiu para a redução dos teores plasmáticos de Cu e da atividade da ceruloplasmina. Eles afirmam que a baixa concentração plasmática de Cu nos grupos não suplementados pode ter diminuído a transferência deste elemento para o feto, resultando em menores níveis de cobre hepático fetal.

O suprimento de Cu dos bezerros até o desmame depende em primeiro lugar da transferência placentária materna durante a gestação. Este Cu, oriundo de fonte materna e acumulado no fígado fetal, deverá suprir a demanda dos meses seguintes até o desmame. Desde o nascimento, até o desmame, o bezerro ingere quantidades insuficientes de Cu no leite e ainda não pasta em quantidade suficiente para satisfazer suas necessidades por esta via. A ingestão de colostro nos primeiros dias de vida consegue elevar as concentrações plasmáticas de Cu e Zn, porém a quantidade de minerais no colostro reduz-se rapidamente nas primeiras 72 horas de vida. Nas primeiras 24 horas de vida o colostro contém 0,12 ppm de Cu e 17,2 ppm de Zn, proporcionando uma ingestão de 1,2 mg de Cu e 20,4 mg de Zn. Após 72 horas, o colostro conterá apenas 0,03 ppm de Cu e 2,5 ppm de Zn (KUME e TANABE, 1993).

Hansard et al. (1968), demonstraram grande elevação das concentrações fetais de Zn durante a gestação, concluindo que 13,5% do total de Zn absorvido pela mãe durante este período é transferido para o feto.

O diagnóstico das deficiências minerais pode ser difícil quando não são observados sintomas característicos que direcionem a investigação para os níveis teciduais ou alimentares de um determinado elemento. Os resultados das análises de solo e de pastagens são difíceis de serem interpretados. Inúmeros fatores atuam no solo e nas forrageiras, alterando a assimilação dos minerais pela planta e pelo animal. Dados sobre a concentração de elementos minerais no solo, na água e nas pastagens apenas complementam a avaliação das deficiências em bovinos. Além disso, a concentração dos elementos minerais na pastagem varia de acordo com fatores climáticos e com o estágio de maturação da planta. Assim, deve-se priorizar a avaliação do conteúdo mineral nos tecidos animais (TOKARNIA et al., 2000).

O tecido que propicia melhor interpretação do estado nutricional de Cu nos bovinos é o hepático. Muitas vezes, a aferição combinada dos níveis séricos deste elemento poderá enriquecer a interpretação. Porém, a grande variação dos

níveis séricos de Cu muitas vezes não reflete o estado nutricional em relação ao elemento (McDOWELL, 1999; SUTTLE 1986; TOKARNIA et al., 2000). Diversos autores, dentre eles, Cousins (1981), Suttle (1986) e Borges (2001) não encontraram correlação entre os teores hepáticos e séricos de cobre em bovinos.

O acesso à deficiência de Zn através da medição dos níveis deste mineral nos tecidos é extremamente complicado, devido à falta de um órgão responsável pelo armazenamento do elemento. Recomenda-se a aferição dos níveis hepáticos de Zn e se possível, a confrontação com os dados de outro tecido (plasma ou soro) (MARSTON, 1999; TOKARNIA et al., 2000). Outra dificuldade é a constante alteração na distribuição de zinco através dos compartimentos orgânicos, principalmente em resposta à fase aguda das infecções. Este efeito é mediado pela interleucina -1, que regula a transcrição da metalotioneína (proteína transportadora de Zn). Ocorre a mobilização de Zn para o espaço intracelular no fígado, timo e medula óssea (KEUSCH, 1994).

Pott et al. (1989a), observaram diferenças sazonais nos níveis hepáticos de cobre de bovinos de corte criados na região central do Pantanal Mato-grossense (Nhecolândia). Os valores nos meses de fevereiro (278 ppm) e agosto (261 ppm) foram significativamente mais elevados que os obtidos em novembro (129 ppm) e maio (239 ppm). Em todos os momentos avaliados, os valores médios obtidos estavam dentro da faixa de normalidade admitida por Underwood (1977) (100 a 400 ppm) mesmo com teores insuficientes de cobre nas gramíneas (entre 2,4 e 4 ppm). Segundo os autores, tal fato explica-se pela possibilidade do cobre ter sido fornecido por outras espécies não gramíneas (com teores de cobre entre 16 e 27 ppm), também ingeridas junto com as pastagens.

Em Roraima, Souza et al. (1989) observaram níveis hepáticos de cobre entre 157 e 271 ppm e 120 e 262 ppm, respectivamente em vacas em lactação e novilhos. Apesar dos baixos teores de Cu das forrageiras (1,5 a 3,6 ppm), os valores observados foram considerados normais (100 a 400 ppm conforme critério de Underwood, 1977). Segundo os autores, o ocorrido pode ser explicado pelos níveis reduzidos de Mo das pastagens. Nos animais jovens foram encontrados valores de 167 ppm na estação das chuvas. Estes teores foram estatisticamente diferentes dos 208 ppm da estação seca. Menores concentrações hepáticas de Cu na época de chuva explicam-se pela maior demanda por este mineral em

períodos de maior crescimento corporal. Níveis adequados de proteína e energia, durante a estação chuvosa, favorecem o crescimento dos animais.

Souza e Darsie, (1985), encontraram deficiência de zinco nas forrageiras de todos os locais estudados em um levantamento das deficiências minerais dos bovinos da região nordeste de Roraima. Os níveis hepáticos do mineral também foram baixos e estas deficiências foram mais pronunciadas na época de chuvas (79 ppm em animais adultos e 76 ppm em jovens).

Em todas as épocas do ano avaliadas por Brum et al. (1987), os níveis de zinco de forrageiras do Mato Grosso foram deficientes, variando de 7,1 a 5,6 ppm. Os teores de zinco no tecido hepático dos bovinos avaliados no mês de novembro foram significativamente superiores (233,8 ppm) em relação aos níveis em agosto (44,5 ppm), fevereiro (106,1 ppm) e maio (107,3 ppm).

Morais et al. (2000), observaram níveis séricos normais de Cu (0,79 e 0,81 mg/L) e Zn (1,43 e 1,33 mg/L) em novilhas mestiças Nelore, respectivamente em solos arenosos e argilosos. As novilhas do experimento foram mantidas em pastagens com níveis insuficientes destes minerais, recebendo suplemento mineral comercial.

1.2) Cu e Zn e resposta imune

Examinando a relação entre a gravidade das deficiências de microelementos e seus efeitos em rebanhos bovinos, observa-se que, em deficiências marginais, o sistema imunológico é o primeiro a ter suas funções comprometidas. Conforme o grau da deficiência se agrava, ocorrerá então o comprometimento do crescimento e da fertilidade dos animais. Deficiências graves poderão ocasionar disfunções metabólicas mais evidentes (MARSTON, 1999 apud WIKSE 1992). Desta maneira, deficiências menos severas também poderão causar prejuízos financeiros elevados pelo comprometimento do estado sanitário e da produtividade dos rebanhos. Assim, quando dietas são formuladas para rebanhos, deve-se considerar a qualidade das forragens e ingestão de conteúdo mineral. Adicionalmente, composição racial e níveis de produção no rebanho podem influenciar as necessidades de suplementação mineral, justificando a necessidade de referências regionais sobre a matéria (MARSTON, 1999).

A função do Cu e do Zn no sistema imunológico dos animais está diretamente relacionada à produção de enzimas do “metabolismo oxidativo”. Estas serão responsáveis pela produção de substâncias microbidas na “explosão respiratória” dos fagócitos, ao mesmo tempo reduzindo o efeito nocivo de tais substâncias sobre os componentes celulares do sistema.

Durante a fagocitose, grandes quantidades de radicais superóxido, gerados pelos próprios fagócitos, são liberados no interior dos fagossomos para destruição das partículas fagocitadas. A enzima Cu-Zn-SOD é responsável pela dismutação de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é o principal substrato para a produção de substâncias microbidas, tais como o íon hipoclorito e radical hidroxila pelo sistema mieloperoxidase-halide (XIN et al. 1991). Então, é possível que baixas concentrações de SOD nos fagócitos levem à redução do potencial microbida pelo decréscimo do suprimento de peróxido de hidrogênio para o sistema mieloperoxidase-halide e produção de radicais hidroxilas nas reações de Harber-Weiss ou Fenton (JONES e SUTTLE, 1981; MINATEL e CARFAGNINI, 2000). O resultante decréscimo na capacidade microbida dos fagócitos se reflete em redução da apresentação de antígenos às células T e cooperação entre células T e B, necessária para a produção de anticorpos (CERONE et al. 1995).

Em adição, a grande quantidade de radicais superóxido, gerados pelos fagócitos durante a explosão respiratória, pode alcançar outras partes destas células e até mesmo os espaços extracelulares, ocasionando dano às estruturas celulares. Assim, a dismutação dos radicais superóxido para peróxido de hidrogênio, catalizada pela Cu-Zn-SOD, possibilitará a posterior inativação em água por outras enzimas como a glutathione-peroxidase e a catalase, prevenindo danos ao funcionamento celular (JONES e SUTTLE, 1981).

A importância clínica desta relação é o aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas, com elevadas taxas de enterites virais, septicemia e pneumonias bacterianas nos bezerros de rebanhos deficientes em Cu (WIKSE et al., 1992).

Jones e Suttle (1981) não encontraram diminuição da capacidade dos neutrófilos em fagocitar *Candida albicans* em bovinos e ovinos deficientes em cobre, entretanto, ocorreu redução do potencial microbida. Foi demonstrada a restauração da função dos neutrófilos quando da posterior suplementação com

cobre. Houve redução dos níveis de Cu-Zn-SOD dos eritrócitos e leucócitos, relativa aos níveis de deficiência de cobre.

Xin et al. (1991) observaram em novilhas a redução da atividade de Cu-Zn-SOD nos eritrócitos e neutrófilos, em paralelo à redução da atividade bactericida dos neutrófilos e níveis hepáticos de cobre. Estes autores consideraram a importância da aferição da atividade de Cu-Zn-SOD como critério adicional para a interpretação do estado nutricional de cobre dos bovinos. A redução da atividade de Cu-Zn-SOD está associada aos estados de deficiência de cobre prolongados sendo importante na interpretação destes casos (SUTTLE, 1986).

Diferentes razões foram enunciadas para explicar o decréscimo no potencial microbicida dos neutrófilos. Arthur e Boyne (1985) observaram redução do potencial microbicida antes que ocorresse decréscimo nos níveis de SOD, indicando que tal efeito pudesse estar relacionado à produção de radicais superóxido pelos neutrófilos. Boyne e Arthur (1981) sugeriram que tal ocorrência poderia estar relacionada à produção celular de nicotinamida-adenosina-difosfato (NADPH) ou NADPH oxidase, importantes para a produção de radicais superóxido pelos neutrófilos. Além disto, a deficiência de Cu altera a expressão de vários genes dos mamíferos, incluindo Cu-Zn-SOD (LAI et al., 1994), Mn-SOD (LAI et al., 1996), catalase (LAI et al., 1996), glutathione-peroxidase (PROHASKA et al., 1992). Verificou-se que as mudanças observadas na atividade de células do sistema imunológico, em resposta à deficiência de Cu, são mediadas por alterações na capacidade de alguns fatores de transcrição específicos, em se ligar ao ácido nucléico (FAILLA e HOPKINS, 1998).

Os neutrófilos são os componentes mais estudados da resposta imune inata dos ruminantes com deficiência de Cu. A redução da função dos neutrófilos é um dos primeiros sinais observados em bovinos sob depleção de Cu, ocorrendo antes do aparecimento de outros sinais clínicos. Potencial microbicida, produção de superóxido e níveis de atividade de SOD estarão reduzidos em bovinos e ovinos deficientes em Cu. Além disto, a capacidade de fagocitose dos neutrófilos também pode estar comprometida em bovinos acometidos por severa deficiência de Cu, induzida pela administração de antagonistas. Entretanto, a função dos macrófagos demonstra-se menos susceptível aos efeitos da deficiência de Cu (MINATEL e CARFAGNINI, 2000).

O potencial fagocitário e microbicida dos macrófagos alveolares de bezerros deficientes em Cu não foi significativamente afetado pelo estado de Cu dos animais. Houve porém, uma tendência ao decréscimo da atividade de SOD e produção de radical superóxido e peróxido de hidrogênio (MINATEL e CARFAGNINI, 2000). Entretanto, sob deficiência de Cu induzida, Saker et al. (1998) observaram redução da capacidade fagocitária e da expressão de complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) dos monócitos periféricos de bezerros com baixos níveis de Cu.

Segundo Minatel e Carfagnini (2000), os macrófagos são importantes não apenas para a imunidade inata, mas também para a imunidade específica atuando, nesse nível, como células apresentadoras de antígenos. Portanto, deve-se estudar com maior profundidade os efeitos da deficiência de Cu sobre estas células, assim como o reflexo sobre a resposta imune específica. Para estes autores os resultados indicando efeito da deficiência de Cu sobre a resposta imune humoral dos bovinos são ainda inconsistentes.

Diferentes autores investigaram o efeito da deficiência de Cu sobre a resposta imune humoral de bovinos e obtiveram resultados variados. Stabel et al. (1993), imunizaram bezerros contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV) e observaram títulos de anticorpos mais elevados em bezerros que receberam nutrição insuficiente em Cu do que naqueles que receberam suplementação do referido elemento. Neste mesmo experimento, os autores não encontraram diferenças significativas entre os títulos de anticorpos contra *Pasteurella haemolytica* em bezerros sob nutrição insuficiente ou suplementada em Cu. Entretanto, os bezerros suplementados com Cu apresentaram tendência aos maiores títulos de anticorpos anti-*Pasteurella haemolytica*, quando comparados aos obtidos pelos animais sem suplementação.

Ward et al. (1997) conduziram experimentação para determinar o efeito da deficiência de Cu, com ou sem a presença de altos níveis nutricionais de Mo ou Fe, sobre a imunidade específica de bezerros. Estes autores utilizaram 38 bezerros, nascidos de vacas mantidas sob dietas experimentais controladas, desde o último terço da gestação até o desmame de suas crias. Dietas não suplementadas com Cu resultaram em níveis plasmáticos indicativos de deficiência, de acordo com os padrões de Underwood (1981) (<0,5 mg/L). Bezerros que não receberam suplementação de Cu (0,30 mg/L de Cu plasmático)

obtiveram títulos de anticorpos em resposta à segunda inoculação de eritrócitos suínos (PRBC), significativamente mais elevados do que os grupos suplementados com Cu, Mo e Fe aos 14 e 21 dias após a inoculação. Não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos dos diferentes grupos na primeira inoculação.

Cerone et al. (1995) alimentaram novilhas da raça Aberdeen Angus com uma dieta contendo excesso de Mo e S por nove meses com objetivo de induzir deficiência de Cu. Estas novilhas foram então vacinadas com a cepa viva S1119 de *Brucella abortus*. Em resposta, estes autores observaram redução dos níveis séricos de cobre (aproximadamente 0,4 mg/L de Cu sérico, quatro meses após o início das dietas do experimento) e da atividade da ceruloplasmina. Níveis séricos totais de imunoglobulina G e complemento também foram reduzidos pelos baixos níveis orgânicos de Cu, quando comparados aos do grupo controle. Títulos de anticorpos contra *Brucella abortus* e proliferação de células mononucleares periféricas em resposta à Concanavalina A foram significativamente menores nas bezerras deficientes em cobre do que no grupo controle. Seguindo a mesma linha, Cerone et al. (1998) observaram redução da capacidade dos neutrófilos em reduzir nitroblue tetrazólium (NBT) e fagocitar eritrócitos ovinos em bovinos com deficiência de cobre secundária, induzida por molibdênio e enxofre. Também foi encontrada redução significativa do número de linfócitos B, sem redução da contagem total de linfócitos e 50% de decréscimo nos níveis de ceruloplasmina dos animais deficientes, quando comparados aos do grupo controle.

Dorton et al. (2003) utilizaram 48 novilhas da raça Aberdeen Angus, com aproximadamente sete meses de idade, para determinar os efeitos das fontes de Cu e suas concentrações sobre a resposta imune de bovinos. As novilhas receberam dieta contendo 7.1 ppm de Cu por 56 dias e depois, por mais 144 dias, receberam dieta com 6.1 ppm de Cu. Os grupos que receberam dieta suplementada com 10 ppm de Cu obtiveram, aos 14 dias após a inoculação de PRBC, títulos mais elevados de anticorpos do que os grupos que receberam suplementação com 20 ppm de Cu. Aos 14 dias após a segunda inoculação de PRBC os grupos suplementados com 20 ppm de Cu obtiveram títulos mais elevados do que os obtidos pelos grupos suplementados com 10 ppm deste mineral e animais não suplementados. Entretanto, 21 dias após a segunda inoculação de PRBC os títulos de anticorpos obtidos pelos animais não

suplementados foram superiores aos observados nos grupos suplementados. Por outro lado, resultados diferentes foram observados com a inoculação de ovalbumina (OVA) nos animais. Aos 14 e 21 dias após a inoculação de OVA, as novilhas que receberam 20 ppm de Cu obtiveram títulos mais elevados de anticorpos do que os animais que receberam 10 ppm deste mineral. Novilhas que receberam 20 ppm de Cu, de fontes orgânicas, obtiveram maiores títulos de anticorpo do que as que receberam o mesmo teor deste mineral, oriundo de fontes inorgânicas (sulfato de cobre). As novilhas que não receberam suplementação obtiveram os títulos de anticorpos mais baixos.

Cerone et al. (1998) adicionaram 30 ppm de Mo e 225 ppm de S à alimentação de seis bezerras da raça Aberdeen Angus (cinco meses), com o intuito de estudar o efeito da deficiência induzida de Cu sobre as células do sangue periférico. A deficiência secundária de Cu foi constatada por níveis séricos abaixo de 5,9 Umol/L. O número total de leucócitos não foi afetado pela deficiência de Cu. Entretanto, a contagem diferencial revelou o significativo aumento do número de monócitos e redução, também significativa do número de linfócitos B. Não houve alteração significativa do número de neutrófilos, entretanto, ocorreu redução da atividade destes polimorfonucleares, caracterizada pelo decréscimo na capacidade de redução do corante NBT e fagocitose de eritrócitos ovinos.

Randhawa et al. (2002) induziram deficiência de Cu em oito bezerros bubalinos adicionando 30 ppm de Mo às suas dietas. Os autores avaliaram os níveis de hemoglobina, hematócrito e contagem total e diferencial do número de leucócitos. A função dos neutrófilos periféricos também foi acessada *in vitro*, avaliando o potencial fagocitário e microbicida sobre *Staphylococcus aureus*. A contagem total dos leucócitos não foi afetada pela deficiência secundária de Cu, apesar de ter ocorrido uma redução significativa do número de neutrófilos. Tal redução coincidiu com o decréscimo dos níveis hepáticos de Cu para 23.9 ± 2.69 ppm. A redução do número de neutrófilos não foi acompanhada por variações na proporção das suas diferentes células precursoras na medula óssea. Os autores concluíram que a neutropenia ocasionada pela deficiência de Cu, induzida por excesso de Mo, não estaria relacionada ao efeito sobre a síntese ou maturação medular de tais células. Em pacientes humanos com deficiência de Cu a neutropenia é um achado comum (WILLIAMS, 1983; PERCIVAL, 1995).

O efeito da quantidade e das fontes de suplementação de zinco na resposta imune de novilhas foi investigado por Spears (1991). Nesse estudo, os grupos que receberam dieta suplementada com fontes de zinco apresentaram títulos de anticorpos em resposta à vacinação contra herpes vírus bovino tipo 1, significativamente maiores que o grupo de animais sem suplementação.

Engle et al. (1997) observaram em bezerras com deficiência marginal de Zn um decréscimo na conversão alimentar e diminuição da resposta imune celular em resposta à injeção intradérmica com o mitógeno fitohemaglutinina - PHA.

Morais et al. (2000) submeteram 128 novilhas Nelore à diferentes níveis de suplementação de Zn. Num dos tratamentos, as novilhas não receberam suplementação de Zn. Em outros, as novilhas receberam 30 ppm de fontes orgânicas, 30 ppm de fontes inorgânicas e ainda 60 ppm de fontes inorgânicas. Segundo os autores, os bezerros nascidos das vacas que receberam suplementação com 30 ppm de Zn orgânico e 60 ppm de Zn inorgânico demonstraram menor incidência de doenças. Os autores ainda quantificaram os níveis séricos de IgG e IgM correlacionando as diferenças entre grupos, sob distintos tratamentos, às diferentes taxas de morbidade.

1.3) *Clostridium chauvoei*

Testes de função imunológica podem ser utilizados como indicadores do impacto da intervenção nutricional sobre os mecanismos intrínsecos de defesa do hospedeiro. A utilização de análises convenientemente inter-relacionadas torna tal avaliação efetiva. Para tanto, é importante a mensuração de diversos níveis de atividades do sistema. A inclusão de testes *in vivo*, como o acesso à resposta imune humoral através da detecção de anticorpos específicos, produzidos em resposta à imunização enriquece tal avaliação (CUNNINGHAM-RUNDLES, 1998).

O *Clostridium chauvoei* é o agente bacteriano causador do carbúnculo sintomático (manqueira) em bovinos, ovinos e outras espécies domésticas e selvagens. É responsável por grandes perdas econômicas, especialmente em regiões onde medidas profiláticas não são tomadas apropriadamente. O controle de tal enfermidade é feito através da administração de vacinas comerciais contendo culturas inativadas em formalina. Protocolos de vacinação com duas doses intercaladas são amplamente recomendados para a indução de resposta

imune de memória, com intuito de assegurar a prevenção da doença (MATTAR et al., 1999; DI GENARO et al., 1999).

Schipper et al. (1978) estudaram a resposta de bezerros à imunização com vacina anti-*Clostridium chauvoei* e observaram que nos filhos de vacas imunizadas, a maior produção de anticorpos ocorreu em bezerros vacinados com quatro a 12 meses de idade, comparada à produção por aqueles vacinados com seis semanas de vida. Tal fato é explicável pela presença dos anticorpos maternos, que, apesar de conferirem proteção durante os primeiros meses de vida, interferem negativamente na síntese de imunoglobulinas pelos bezerros e impedem o sucesso da vacinação em animais muito jovens (TIZARD, 2000).

Silva (2003) avaliou os níveis de gama globulina, dos mesmos bezerros utilizados nesta pesquisa, até os seis meses de idade e observou os menores níveis, durante o segundo e terceiro meses de vida (respectivamente 0,44 e 0,57 g/dL e que foram estatisticamente semelhantes). Posteriormente, os níveis começaram a se elevar. Entretanto, somente no quinto mês de vida, estes valores se elevaram significativamente em relação aos observados no segundo e terceiro meses de idade (quarto mês: 0,68 g/dL; quinto mês: 0,82 g/dL).

O reforço da vacinação é prática recomendável, pois estimula maior produção de anticorpos e melhor imunização do gado que a recebe. As características da resposta imunológica frente ao desafio do reforço vacinal são diferentes da resposta à primeira vacinação. Na idade da primeira vacinação, os bezerros que já ultrapassaram a fase de catabolismo das imunoglobulinas recebidas pelo colostro, iniciam a produção endógena de anticorpos. No caso da resposta imune ao reforço da vacina existe uma forte resposta de memória, devido à atuação de células T de memória e proximidade da imunização anterior. Isto induz uma maior produção de anticorpos num período de tempo mais curto (TIZARD, 2000).

Tamura et al. (1985) desenvolveram uma prova de hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos contra *Clostridium chauvoei*. Utilizaram como antígeno, extratos celulares da bactéria obtidos por tratamento ultrassônico. Esta técnica demonstrou praticidade e especificidade na detecção de anticorpos contra este organismo. Posteriormente, estes mesmos autores relataram correlação positiva entre a detecção de anticorpos pela técnica de hemaglutinação indireta anteriormente proposta e a proteção conferida por

imunógenos de *Clostridium chauvoei* em camundongos. Estes autores indicaram a metodologia para a avaliação de vacinas anti-carbúnculo e como prova adicional em testes de proteção de camundongos (TAMURA et al., 1986).

Os títulos de anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* também podem ser quantificados através de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), conforme a metodologia descrita por Crichton et al. (1990). Estes autores desenvolveram uma técnica simples para ser utilizada em coelhos e servir como alternativa para os testes de susceptibilidade em cobaias. Foi encontrada correlação entre os títulos de anticorpos medidos pela metodologia de ELISA e a proteção observada nos testes de desafio, permitindo a utilização da técnica para conferir a eficiência de vacinas, evitando o sacrifício de animais e gastos na sua manutenção.

Considerando a importância do efeito das deficiências de Cu e Zn sobre o sistema imunológico dos bovinos e a carência de informações sobre o efeito destes minerais na resposta imune humoral e variáveis do hemograma de bovinos, delineou-se esta pesquisa. Os resultados obtidos acrescentarão subsídios ao estudo do efeito do Cu e Zn, sobre os aspectos clínicos e resposta imunológica de bezerros Nelore criados extensivamente. Permitirão também, recomendações mais consistentes sobre formulação de misturas minerais, contribuindo para a redução das perdas econômicas provocadas pela inadequada utilização destes nutrientes.

2) OBJETIVOS

- A) Avaliar o efeito da nutrição adequada e da insuficiente em cobre ou zinco, sobre os teores hepáticos e séricos destes elementos minerais, nos bovinos Nelore deste experimento.
- B) Estudar o efeito de dietas com teores adequados e insuficientes em cobre e zinco sobre a produção de anticorpos dos bezerros, em resposta à vacinação contra *Clostridium chauvoei*.
- C) Avaliar o efeito das dietas com diferentes teores de cobre e zinco sobre as variáveis do hemograma, em resposta à vacinação dos bezerros contra *Clostridium chauvoei*.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Animais e características dos grupos experimentais

Foram utilizados 30 bezerros da raça Nelore, de ambos os sexos, nascidos de vacas mantidas por 18 meses sob nutrição mineral adequada ou insuficiente em Cu ou Zn. O grupo Controle foi estabelecido com 10 bezerros que nasceram das vacas submetidas a uma nutrição mineral adequada (Cu = 10 ppm e Zn = 30 ppm, conforme o NRC, 1996). O grupo -Zn foi constituído por 10 bezerros que nasceram das vacas com fornecimento mineral insuficiente em zinco (23 ppm de Zn) e o grupo -Cu foi constituído por 10 animais que nasceram das vacas com fornecimento mineral insuficiente em cobre (seis ppm de Cu).

3.2) Suplementação mineral

O pasto formado por *B. decumbens*, disponível para a realização deste experimento, foi submetido à análise da sua composição (UNESP - Faculdade de Ciências Agrônômicas - Departamento de Ciência do Solo - Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas), obtendo-se os seguintes teores de minerais: N = 5 g/kg, P = 0,8 g/kg, K = 8 g/kg, Ca = 3 g/kg, Mg = 2,6 g/kg, S = 0,6 g/kg, B = 6 ppm, Cu = 6 ppm, Fe = 153 ppm, Mn = 278 ppm, Zn = 23 ppm, Mo = 2 ppm. Um sal mineral foi formulado com base nestes dados, de forma a suprir os requerimentos diários de bovinos da raça Nelore, em todas as suas fases, conforme recomendações do NRC (1996) e de McDowell (1999) (Tabela 1). Este sal mineral foi oferecido *ad libitum* em cocho coberto para as novilhas do grupo Controle. O grupo -Zn recebeu a mesma mistura, porém sem adição de fontes de zinco e o grupo -Cu recebeu a mesma mistura que o grupo Controle sem a adição de fontes de cobre, ambos em cocho coberto.

Antes de parirem os bezerros utilizados nesta pesquisa, as matrizes receberam os diferentes suplementos minerais do experimento por 18 meses (de abril/2000 a setembro/2001) compreendendo um período de adaptação (de abril/2000 a novembro/2000), estação reprodutiva (30 dias entre dezembro/2000 e janeiro/2001) e passaram toda a gestação recebendo as diferentes misturas minerais propostas.

Os bezerros foram acompanhados clinicamente, do nascimento até os seis meses de vida. Neste período permaneceram com suas respectivas mães e

tiveram à sua disposição o mesmo fornecimento mineral correspondente ao grupo original materno.

QUADRO 1: Composição das misturas minerais formuladas com base na análise de pastagem

Suplemento mineral	P (%)	Cu (%)	Zn (%)	Co (%)	Na Cl (%)	Se (%)
Grupo Controle	68	0,625	0,765	0,007	30,6	0,003
Grupo -Zn	68	0,625	0	0,007	31,365	0,003
Grupo -Cu	68	0	0,765	0,007	31,225	0,003
Fontes	Fosfato Bicálcico	CuSO ₄	ZnSO ₄	CoSO ₄	NaCl	Selenito de Sódio

3.3) Controle sanitário do rebanho

As matrizes do experimento receberam diagnóstico negativo para leptospirose, brucelose e leucose bovina à vírus, mediante a realização de provas sorológicas específicas. Estas fêmeas receberam vacina contra febre aftosa anualmente (conforme recomendação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Foi administrada uma dose de vacina polivalente contra clostridioses, incluindo imunógenos anti-*Clostridium chauvoei* em março/2000 (aproximadamente 18 meses antes das matrizes parirem). Também receberam uma dose de vermífugo (ivermectina) antes do início do experimento e três vezes ao ano (Janeiro, Junho e Agosto). O controle do berne (*Dermatobia hominis*) e da mosca do chifre (*Haematobia irritans*) foi realizado sempre que necessário.

3.4) Colheita de amostras das fêmeas adultas

Foram colhidos fragmentos de fígado, de todas as matrizes de cada grupo. Estas colheitas foram realizadas no momento anterior à colocação das novilhas nas diferentes dietas (C1 - março/2000), 15 dias antes da colocação dos animais em estação reprodutiva (C2 - setembro/2000) e uma última colheita foi efetuada uma semana após o parto (C3 - setembro de 2001). Foram efetuadas dosagens de cobre e zinco hepático neste material, para posterior comparação com os níveis destes elementos nos bezerros. Os fragmentos de tecido hepático foram colhidos com os animais em estação, no tronco de contenção, conforme a técnica adaptada de Smart e Northcole (1985). Esta consiste em anestesia local

com lidocaína a 2%, anti-sepsia com iodopovidona, incisão da pele com bisturi e penetração da cavidade abdominal com a agulha. Esta deverá estar posicionada na interseção da linha imaginária, traçada paralelamente ao eixo dorsal, partindo do ponto médio da fossa paralombar direita até o 11^o espaço intercostal. Após a penetração da cavidade abdominal na inserção do diafragma com a parede torácica, o mandril da agulha foi retirado e a cânula deslocada no sentido crânio-ventral, na direção da articulação úmero-rádio-ulnar do membro esquerdo. Com movimentos de rosca, a cânula foi introduzida no parênquima hepático. Pressão negativa foi produzida obstruindo-se o orifício externo da cânula com o polegar, durante a retirada do conjunto. As amostras foram secas em papel de filtro, pesadas e armazenadas sob temperatura de -20°C em tubos plásticos de 1,5mL para posterior análise dos elementos minerais. A agulha utilizada foi confeccionada com as seguintes dimensões: comprimento do mandril 25 cm, comprimento da cânula 23 cm, diâmetro interno da cânula 0,7cm e externo 0,8cm.

3.5) Vacinação dos bezerros

Os bezerros do experimento foram vacinados aos 180 dias de vida (M7) com vacina comercial contra carbúnculo sintomático¹, obtida por inativação de cultivos de *Clostridium chauvoei* em formalina e adsorção em hidróxido de alumínio. A vacina, conservada sob condições indicadas pelo fabricante foi administrada com seringa plástica descartável e agulha hipodérmica 30 x 1,0 mm por via subcutânea, na dose recomendada (2,0 mL). A idade em que foi feita a vacinação está de acordo com dados relatados por Schipper et al. (1978), que estudaram a resposta de bezerros à imunização com vacina anti-*Clostridium chauvoei*. Trinta e seis dias após terem recebido a vacina os bezerros do experimento receberam uma segunda dose da mesma como reforço (M15).

3.6) Acompanhamento dos bezerros e colheita do material

Os bezerros foram acompanhados clinicamente até o final do experimento. Inicialmente foram colhidas amostras em seis momentos antes dos animais completarem seis meses e receberem a primeira vacinação (M1 a M6). Estas amostras foram colhidas durante a primeira semana de vida (M1) e depois

¹ Monovacina® Vallée S.A. Montes Claros MG.

mensalmente, até os animais completarem cinco meses de idade (M2 A M6). Este material se destinaria à titulação de anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* recebidos via colostro e mensuração dos níveis de superóxido-dismutase eritrocitária. Aos 150 dias de vida (M6), para medir os teores de cobre e zinco, foram colhidos fragmentos de tecido hepático, novamente pela técnica de Smart & Northcole(1985)(Tabela3).

QUADRO 2. Momentos de avaliação efetuados antes dos animais completarem seis meses de idade e receberem a primeira vacinação (M1 A M6)

Momento/Data	Material obtido	Análises correspondentes
M1 – 1 semana p.p.	1- Soro 2- Hemácias (sangue c/ heparina)	1- Anticorpos 2- superóxido-dismutase - SOD
M2 – 1 mês	1- Soro 2- Hemácias (sangue c/ heparina)	1- Anticorpos 2- SOD
M3 – 2 meses	1- Soro 2- Hemácias (sangue c/ heparina)	1- Anticorpos 2- SOD
M4 – 3 meses	1- Soro 2- Hemácias (sangue c/ heparina)	1- Anticorpos 2- SOD
M5 – 4 meses	1- Soro 2- Hemácias (sangue c/ heparina)	1- Anticorpos 2- SOD
M6 – 5 meses (150 dias)	1- Soro 2- Hemácias (sangue c/ heparina) 3- Fígado	1- Anticorpos 2- SOD 3- Cu e Zn hepáticos

Aos 180 dias de vida os bezerros receberam a primeira dose de vacina contra *Clostridium chauvoei*. Para a avaliação do hemograma, amostras de sangue foram então colhidas no momento imediatamente anterior à aplicação da vacina (M7) e depois com oito horas (M8), um (M9), dois (M10), três (M11), sete (M12), 15 (M13) e 21 dias após (M14). Uma outra dose da vacina foi aplicada 36 dias após a primeira e novos momentos de colheita foram instituídos, seguindo o esquema efetuado após a primeira dose da vacina. A saber: uma primeira colheita foi efetuada imediatamente antes da aplicação do reforço vacinal (M15) e posteriormente outras seis colheitas foram feitas, sendo a primeira delas com oito horas (M16), um (M17), dois (M18), três (M19), sete (M20) e 15 dias após a administração do reforço vacinal (M21). Os títulos de anticorpos em resposta à vacinação foram medidos em amostras de soro obtidas imediatamente antes da vacinação (M7), 15 dias após a vacina (M13), 21 dias após a vacina (M14), imediatamente antes do reforço vacinal (M15) e 15 dias após o mesmo (M21). A dosagem dos níveis séricos de cobre e zinco foi efetuada em amostras colhidas durante o M7, M15 e M21 (Tabelas 4 e 5).

QUADRO 3. Datas dos momentos de avaliação referentes à primeira vacinação: material coletado e análises correspondentes

Momento/Data	Material obtido	Análises correspondentes
M7 – 180 dias (imediatamente antes da vacina)	1- Sangue c/ EDTA 2- Soro 3- Soro (Tubo s/ contaminantes minerais)	1- Hemograma 2- Anticorpos 3- Cu e Zn sérico
M8 – 8 horas após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M9 – 1 dia após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M10 – 2 dias após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M11 – 3 dias após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M12 – 7 dias após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M13 – 15 dias após	1- Sangue c/ EDTA 2- Soro	1- Hemograma 2- Anticorpos
M14 – 21 dias após	1- Sangue c/ EDTA 2- Sangue / Soro	1- Hemograma 2- Anticorpos

QUADRO 4. Datas dos momentos de avaliação referentes à segunda vacinação: material coletado e análises correspondentes

Momento/Data	Material obtido	Análises correspondentes
M15 – imediatamente antes do reforço da vacina)	1- Sangue c/ EDTA 2- Soro 3- Soro (Tubo s/ contaminantes minerais)	1- Hemograma 2- Anticorpos 3- Cu e Zn sérico
M16 – 8 horas após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M17 – 1 dia após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M18 – 2 dias após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M19 – 3 dias após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M20 – 7 dias após	1- Sangue c/ EDTA	1- Hemograma
M21 – 15 dias após	1- Sangue c/ EDTA 2- Soro 3- Soro (Tubo s/ contaminantes minerais)	1- Hemograma 2- Anticorpos 3- Cu e Zn sérico

3.7) Processamento do material obtido

3.7.1) Dosagem do cobre e zinco hepático

A quantificação dos minerais presentes nas amostras de fígado foi obtida empregando-se a técnica de espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma de argônio, indutivamente acoplada, pelo espectrômetro simultâneo BAIRD². Uma amostra de fígado bovino certificada³ foi seca em estufa, a 110°C, por 12 horas, sendo em seguida utilizada para a validação da metodologia.

Foram realizados testes preliminares para escolha do método de preparação das amostras de fígado bovino. Foi então empregada a metodologia da digestão ácida de Asp & Lund (1992). Foram pesados 0,2000 + 0,0011 g de

² Modelo ICP 2000 Massachusetts, USA

cada amostra de fígado bovino em tubos de vidro, acrescentando-se 15 mL de ácido nítrico concentrado. Iniciou-se o aquecimento do bloco digestor a 50°C, cuja temperatura se elevou de 10 em 10°C, a intervalos de 30 minutos até 160°C. Aqueceu-se até o volume atingir aproximadamente cinco mL. As amostras foram, então transferidas para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com ácido clorídrico 5% v:v. As amostras de fígado colhidas dos animais do experimento foram então processadas como anteriormente descrito para a amostra certificada.

3.7.2) Dosagem de cobre e zinco sérico dos bezerros

A metodologia de preparo das amostras de soro foi adaptada de Subramaniam (1996) para a determinação dos minerais Cu e Zn: pesaram-se 0,500g da amostra em um frasco de Becker e adicionaram-se 10 mL de ácido nítrico concentrado. Em seguida, a amostra foi digerida em chapa elétrica aquecida, por 3 horas. Após esfriar, transferiu-se quantitativamente a amostra para balão volumétrico de 25 mL e que foi preenchido com solução de ácido clorídrico a 5% (v/v).

A curva analítica para a quantificação dos elementos minerais Cu e Zn foi preparada com diluições seriadas da solução padrão⁴ (concentração aferida de 1,000mg L⁻¹) em solução de ácido clorídrico 5% (v/v) nas seguintes concentrações: 0,005; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100 e 0,250 mg L⁻¹.

Para a quantificação dos elementos minerais Cu e Zn, foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio induzido (ICP-OES)⁵. As condições ótimas para determinação multielementar foram estabelecidas para o elemento manganês, conforme recomendações do fabricante. Os comprimentos de onda (nm) usados foram: cobre 324,754 e zinco 206,200. Os parâmetros instrumentais utilizados estão descritos na Tabela 6.

³ 1577b – Bovine Liver do National Institute of Standards and Technology (NIST-USA)

⁴ Merck ©

⁵ VARIAN®, VISTA-MPX®, Mulgrave, Austrália.

QUADRO 5. Condições de operação do espectrômetro com configuração axial para as determinações dos minerais Cu e Zn

Potência do plasma(Kw)	1,0
Gás refrigerante(Ar) (L min ⁻¹)	15
Gás auxiliar (Ar) (L min ⁻¹)	1,5
Pressão do nebulizador (kPa)	200
Gerador de rádio freqüência (MHz)	40
Tempo de estabilização (segundos - s)	10
Tempo de leitura (segundos - s)	10

3.7.3) Quantificação de SOD eritrocitária

Optou-se pela determinação da atividade de SOD em eritrócitos lisados, obtidos de amostras de sangue colhidas dos bezerros durante os seis primeiros meses de vida. As determinações foram efetuadas em aparelho analisador bioquímico⁶ utilizando-se *Kit* RANSOD⁷. Considerando o potencial da SOD em acelerar a dismutação do radical superóxido para peróxido de hidrogênio e água, o *kit* empregado baseia-se na utilização de xantina oxidase para a formação de radicais superóxido. Os radicais superóxido reagem com 2(4-iodofenil) 3(4-nitrofenol) 5-feniltetrazolium (I.N.T) presente no *kit*, formando o corante formazan vermelho. A atividade de SOD pode então ser mensurada indiretamente pelo grau de inibição desta reação avaliado ao espectrofotômetro.

Foram utilizadas amostras de sangue colhidas em frascos contendo heparina como anticoagulante. Tais amostras foram processadas imediatamente depois de coletadas produzindo-se a hemólise das hemácias. A saber:

- depois de coletadas, as amostras de sangue total (alíquotas de 0,5 ml) foram centrifugadas por 10 minutos e tiveram a porção de plasma retirada por aspiração. A porção de células resultante foi então lavada três vezes, com 3,0 mL de solução fisiológica, sob centrifugação por 10 minutos em cada lavagem. A cada lavagem retirava-se a capa de leucócitos resultante para que apenas as hemácias fossem aproveitadas. Após as três lavagens, as hemácias receberam dois mL de água destilada e foram então mantidas por 15 minutos a 4°C para que ocorresse a hemólise do material.
- a porção de hemácias hemolizadas de cada amostra foi então estocada a –

⁶ Aparelho Analisador Bioquímico RaxT Cobas Mias ®

⁷ RANSOD® Randox Laboratories LTDA. Antrim, Reino Unido.

70° C até o momento da análise, para conservação de suas características originais.

- para efetuar o processamento das amostras, utilizou-se o aparelho analisador bioquímico automático RAxT, regulado conforme as condições de análise prescritas nas instruções do *kit*. Os resultados foram apresentados como Unidade de SOD por grama de hemoglobina (U/g Hb), sendo que a concentração de hemoglobina nas amostras foi medida na ocasião da colheita, utilizando-se o contador automático de células⁸.

3.7.4) Titulação de anticorpos em resposta à vacinação.

Optou-se pela metodologia de ELISA para titulação de anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* proposta por Crichton et al. (1990). A saber:

- Cultivo de *Clostridium chauvoei* (Antígeno) – Foi utilizado cultivo de *Clostridium chauvoei* inativado em formalina e adsorvido ao meio de cultura. A cepa bacteriana presente no cultivo inativado foi a mesma utilizada para a fabricação da vacina.
- Soro controle positivo – Utilizou-se um *pool* de soros colhidos dos animais do grupo Controle aos 15 dias após o reforço da vacinação (M21).
- Soro controle negativo - *Pool* de soros colhidos dos bezerros antes que estes tivessem mamado colostro.
- Anticorpos - Anticorpo produzido por coelho anti-IgG de bovino e marcado com peroxidase⁹.
- Placas de microtitulação - Alta capacidade de adsorção¹⁰, 96 poços com fundo chato.

3.7.4.1) Produção do antígeno

O cultivo de *Clostridium chauvoei* inativado em formalina e adsorvido ao meio de cultura foi descongelado em temperatura ambiente. Duas alíquotas de 25 mL do cultivo foram separadas em tubos de fundo cônico. Uma das alíquotas foi então centrifugada a 3000 G por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e ao cultivo aderido ao fundo, foi adicionado tampão PBS até atingir

⁸ Cell-Dyn 3500R Abott®

⁹ DakoCytomation® Glostrup, Dinamarca.

¹⁰ Nunc Maxisorp® Nalg Nunc International®

25 mL de solução total. Este procedimento foi repetido mais duas vezes com intuito de lavar as células de *Clostridium chauvoei* para retirar os resíduos de cultivo, sem alterar suas propriedades antigênicas. Ao final da última centrifugação e retirada do líquido sobrenadante, foi adicionado 2,5 mL de tampão PBS ao *pellet* resultante.

Foi efetuado o tratamento ultra-sônico das bactérias lavadas. O tubo com as células foi mantido em gelo e submetido a 15 ciclos de 30 segundos cada utilizando frequência de 20 KHz. Após o tratamento ultra-sônico, uma gotícula do material foi corada pelo método de Gram para confirmação da ruptura das células bacterianas.

Os 2,5 mL de material tratado por ultra-som foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 10.000 G sob 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se tampão PBS até atingir volume total de 15 mL. O material foi então centrifugado novamente e após a retirada do sobrenadante, foi adicionado tampão PBS até atingir novamente um volume final de solução de 2,5 mL. Os 2,5 mL de solução foram então centrifugados outra vez a 10.000 G por mais 10 minutos sob 4°C e o sobrenadante foi separado para ser utilizado como antígeno.

Foi feita a determinação da concentração protéica do sobrenadante da solução a ser utilizado como antígeno. O teor de proteínas, determinado pelo método de Bradford, foi de 3,42 mg/mL. A concentração protéica do antígeno utilizado por Crichton et al. (1990) foi de 1,5 a 3,0 mg/mL.

3.7.4.2) Sensibilização das placas de microtitulação com o antígeno

Crichton et al. (1990) utilizaram solução de antígeno com 20 a 30 µg/mL para sensibilização das placas de microtitulação. Para adequação ao sistema experimental, os valores citados foram utilizados como referência, porém testou-se o antígeno nas concentrações de cinco, 10, 20 e 40 µg/mL, partindo da solução original com 3,42 mg/mL. Assim, 100 µL das soluções diluídas do antígeno foram colocadas nos poços de uma placa de microtitulação. As placas foram mantidas a 4°C *overnight* para adsorção do antígeno às mesmas. Após este período, a placa foi lavada três vezes com tampão PBS com 0,05% de “Tween 20” (PBST) por 60 segundos em cada lavagem. Após os testes, concluiu-se que a melhor concentração do antígeno era a de 10 µg/mL.

3.7.4.3) Bloqueio das placas

Utilizou-se tampão carbonato/bicarbonato com 10% de leite em pó desnatado. A placa recebeu em cada poço 200 μ L do referido tampão e foi mantida por 60 minutos a 37°C. Após este período a placa foi lavada três vezes com tampão PBST por 60 segundos em cada lavagem.

3.7.4.4) Adição das amostras de soro dos bezerros

Foram testadas as diluições 1:100, 1:200 e 1:400 (v:v) para as amostras de soro. As amostras foram diluídas em tampão PBST com 10% de leite em pó desnatado e em cada poço foram adicionados 100 μ L de solução diluída de soro. A placa foi mantida por 60 minutos a 37°C para que ocorresse a ligação dos anticorpos anti-*Clostridium chauvoei*, presentes no soro dos bezerros, aos antígenos adsorvidos à placa. Após este período, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST por 60 segundos em cada lavagem. Os testes efetuados permitiram concluir de que a amostra de soro diluída 400 vezes (v:v) se adequava melhor ao sistema.

3.7.4.5) Adição do anticorpo anti-IgG de bovino e marcado com peroxidase

A diluição recomendada pelo fabricante do anticorpo foi de 1:1000 (v:v) em tampão PBST com 10% de leite em pó desnatado. Feita a diluição, 100 μ L de solução do anticorpo foram adicionados a cada poço e mantidos por 60 minutos a 37°C para que este anticorpo conjugado pudesse se ligar aos anticorpos anti-*Clostridium chauvoei*, dos bezerros, que já estavam aderidos indiretamente à placa. Após este período a placa foi lavada três vezes com tampão PBST por 60 segundos em cada lavagem.

3.7.4.6) Adição do cromógeno ortofenilamina diamina (OPD)

Foi preparada uma solução com 10 mg de OPD em 25 mL de tampão heparina-fosfato (0,05 M, pH 5). Uma vez preparada esta solução, 10 μ L de peróxido de hidrogênio foram adicionados. Após rápida homogeneização da solução resultante, 100 μ L dela foram adicionados a cada poço da placa e manteve-se a mesma por 15 minutos sob agitação. Ao final deste tempo, foram

adicionados 50 μ L de solução de ácido clorídrico a 2N em cada poço, para finalizar a reação. Procedeu-se então a leitura a 492 nm em aparelho leitor apropriado¹¹.

3.7.5) Hemograma

As contagens de hemácias, leucócitos e as determinações dos teores de hemoglobina foram realizadas em contador automático de células¹².

O volume globular foi determinado pelo método do microhematócrito (COLES, 1984), no mesmo dia da colheita. O fibrinogênio foi determinado pela técnica de precipitação no tubo de microhematócrito a 56°C. A proteína total plasmática foi determinada por refratometria (JAIN, 1986).

3.8) Análise dos resultados

Para as variáveis avaliadas em um só momento (Cu e Zn hepático materno) foi utilizada a análise de variância para experimento inteiramente aleatorizado, com cálculo das estatísticas F e P e contrastes entre pares de médias pelo método de Tukey. Para as variáveis avaliadas em mais de um momento foi utilizada a análise de perfil (MORRISON, 1967), com os testes das hipóteses descritas a seguir:

- 1- Interação entre grupos e momentos: verifica a similaridade (ausência de interação) ou a não similaridade (presença de interação) entre os perfis dos três grupos experimentais;
- 2- Diferença entre grupos no conjunto dos momentos: só será considerada no caso de ausência de interação (perfis similares) e verifica se os perfis são iguais ou em níveis diferentes;
- 3- Diferença entre momentos no conjunto dos três grupos: esta hipótese, também só será considerada nos casos em que houver similaridade dos perfis (ausência de interação) e verifica o efeito de momento no conjunto dos três grupos;
- 4- Diferença entre grupos em cada momento;
- 5- Diferença entre momentos, dentro de cada grupo.

¹¹ Multiskan EX® Biosystems©

¹² Cell-Dyn 3500R Abott®

Em todas as hipóteses testadas, as estatísticas F calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$

4. Resultados e Discussão

4.1 Níveis hepáticos de cobre das matrizes

Houve diferença entre os níveis de Cu observados nos diferentes grupos de matrizes (Tabelas 1 e 2). Na ocasião da primeira colheita (março, 2000), quando as matrizes ainda não haviam sido submetidas às dietas do experimento, o grupo -Zn, que seria submetido à mineralização insuficiente em Zn já apresentava os maiores valores de Cu (366,10 ppm) significativamente superiores aos níveis observados nos animais do grupo -Cu, que seriam submetido à dieta insuficiente em Cu (254,42 ppm) (Tabela 1). Os valores observados nos animais do grupo Controle foram intermediários, ou seja, não diferiram significativamente do grupo -Zn ou -Cu, naquele momento de avaliação (Tabela 2). Cabe salientar que a distribuição dos animais pelos grupos experimentais foi aleatória, sem qualquer tipo de direcionamento baseado em análises de minerais. No segundo momento de avaliação, após seis meses de adaptação às dietas do experimento (setembro de 2000), observou-se que os níveis de Cu dos grupos Controle e -Zn foram semelhantes entre si (252,65 e 277,41 ppm) e estatisticamente superiores aos teores do grupo -Cu (184,01 ppm) (Tabelas 1). Além disto, na terceira colheita, 12 meses após a segunda, observou-se que o grupo em dieta insuficiente em Cu também apresentava níveis de Cu inferiores (249,25 ppm) aos encontrados no grupo -Zn (348,62 ppm), apesar de estatisticamente não diferirem dos teores do grupo Controle (234,23 ppm) (Tabela 1). Nota-se também que nos grupos -Zn e -Cu, houve significativa redução dos níveis hepáticos de Cu entre a primeira (março/chuvas) e a segunda colheita (setembro/seca). Porém, o intervalo de tempo até a terceira colheita (setembro 2001) foi suficiente para estes níveis se elevarem significativamente, até alcançarem os valores observados no material obtido na primeira colheita (Tabela 2). A proximidade entre a terceira colheita e o parto torna mais difícil a interpretação destes achados. Sabe-se que as vacas aumentam os estoques hepáticos de micronutrientes durante o terço final da gestação. Estas reservas formadas servem para suprir as necessidades do período puerperal, geradas pelo grande aporte de nutrientes para a produção do colostro e manutenção da lactação (SMART et al., 1983; XIN et al., 1991). Não foram encontrados níveis hepáticos de Cu inferiores aos considerados normais por Underwood (1977) (100 a 400 ppm), Fick et al. (1979) (100 a 300 ppm),

Graham (1991) (30 a 120 ppm), Marston (1999) (25 a 100 ppm) ou McDowell (1999) (100 a 300 ppm) em nenhum dos grupos sob diferentes tratamentos.

Pott et al. (1989) também verificaram redução sazonal dos níveis de Cu hepático dos bovinos, tendo os autores encontrado em novembro (seca), valores mais baixos deste elemento do que nos meses de fevereiro (chuvas) e maio (fim das chuvas). Estes achados são semelhantes aos observados nesta pesquisa nas duas primeiras colheitas. Estes autores embora não tenham encontrado variação sazonal de Cu nas pastagens, observaram oscilações nos níveis hepáticos. Segundo Suttle (1986), a estabilidade dos teores de Cu nas pastagens com variação da concentração hepática é possível devido à diferença na biodisponibilidade do elemento, causada por fatores climáticos característicos de cada época do ano.

Moraes et al. (2000), também não observaram deficiência nos níveis séricos de Cu de 20 vacas aneloradas mantidas em pastos de *Brachiaria decumbens* com alta lotação e níveis de Cu considerados abaixo das necessidades dos bovinos. Essas vacas também estavam em período gestacional e apresentaram diferenças sazonais dos valores de Cu, atribuídas pelos autores à estação do ano. Os níveis mais elevados foram observados nos meses com maior precipitação pluviométrica (março com 1,7 e 0,97mg/dL respectivamente para novilhas em solo arenoso e argiloso) e os menores foram obtidos durante o inverno (agosto 0,63 mg/dL nos dois grupos) e início da primavera (outubro 0,51 e 0,61 mg/dL), coincidindo com os resultados desta pesquisa.

TABELA 1. Médias e desvios padrões dos níveis hepáticos de cobre (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)

Grupos		C1 Mar/2000	C2 Set/2000	C3 Set/2001	Média grupos
Controle (n=10)	Média	290,51 ^{ABa}	252,65 ^{Ab}	234,23 ^{Bb}	259,13
	s	± 99,69	± 67,13	± 101,56	
-Zn (n=10)	Média	366,10 ^{Aa}	277,41 ^{Ab}	348,62 ^{Aa}	330,71
	s	± 73,70	± 59,92	± 80,79	
-Cu (n=10)	Média	254,42 ^{Ba}	184,01 ^{Bb}	249,25 ^{Ba}	229,23
	s	± 64,96	± 51,82	± 61,03	
Média momentos		303,69	238,02	277,37	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 2. Cobre hepático materno, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 4,64; p<0,05	Interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferença entre grupos em cada momento	C1: F= 4,97; p<0,05 C2: F= 6,51; p<0,05 C3: F= 5,64; p<0,05	C1: -Zn>-Cu (Contr intermediário) C2: (Contr =-Zn)>-Cu C3: -Zn>(Contr=-Cu)
5- Diferenças entre momentos em cada grupo	Contr: F= 10,67; p<0,05 -Zn: F= 27,83; p<0,05 -Cu: F= 17,54; p<0,05	Contr: C1>(C2=C3) -Zn: (C1=C3)>C2 -Cu: (C1=C3)>C2

Obs: hipóteses 2 e 3, sem efeito diante do resultado da primeira

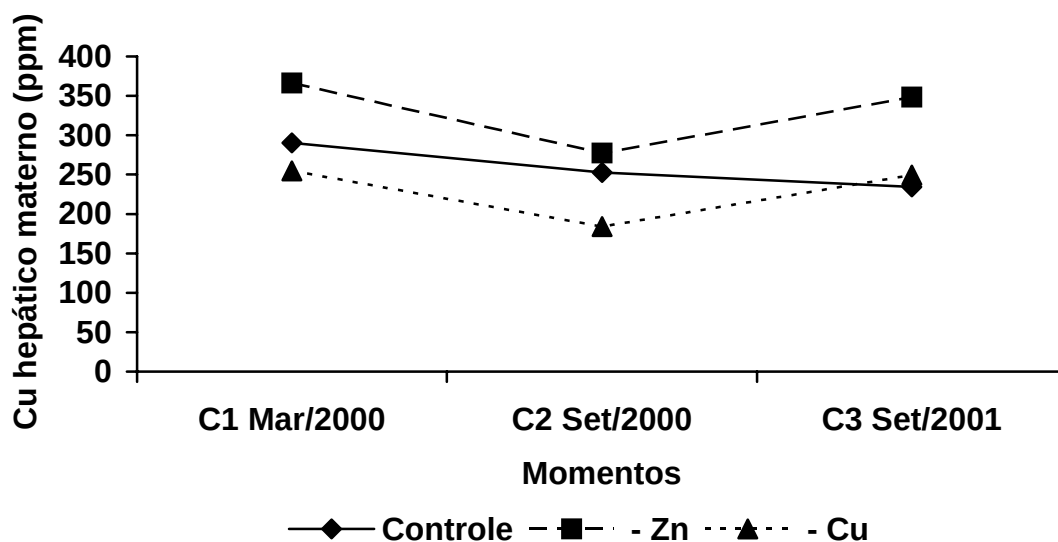


FIGURA 1. Gráfico das médias dos níveis hepáticos de cobre (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)

4.2. Níveis hepáticos de zinco nas matrizes

Não houve diferença significativa entre os níveis medios de Zn observados nos três grupos, em nenhum dos momentos de avaliação (Controle=85,72; -Zn=81,86; -Cu=82,94 ppm) (Tabelas 3 e 4). Nota-se também, que a despeito das dietas, os níveis de Zn mais elevados foram obtidos na última colheita, em todos os grupos (-Cu=90,12 e Controle=79,71=-Zn=80,68 ppm) (Tabelas 3 e 4). Além disto, os valores médios observados nos diferentes grupos estão dentro do intervalo de valores considerados normais por Graham (1999). Entretanto, todas as médias das amostras obtidas durante a primeira e segunda colheita estiveram abaixo dos valores citados como adequados por Fick et al. (1979) (84 a 132 ppm). Até mesmo os animais do grupo -Cu apresentaram valores considerados inferiores ao adequado por este critério. A média geral dos resultados das duas primeiras colheitas esteve abaixo do intervalo de valores considerado normal por Fick et al. (1979). Todas as médias obtidas estão abaixo dos níveis considerados adequados por Underwood (1977) (> 125 ppm). Apesar disto, segundo Marston (1999), apenas valores entre 25 e 40 ppm podem ser considerados indicativos de deficiência marginal e níveis indicativos de deficiência, somente abaixo dos 25 ppm.

As diferenças significativas entre as médias obtidas durante a primeira (março de 2000) e a segunda colheita (setembro de 2000) em relação aos valores observados na terceira (setembro 2001) podem não estar refletindo adequadamente o estado nutricional de zinco no momento avaliado (Tabela 4). Pela proximidade do parto os níveis hepáticos de zinco podem ter sido afetados.

O acesso à deficiência de Zn através da medição dos níveis deste mineral nos tecidos é extremamente complicado devido à falta de um órgão responsável pelo armazenamento deste elemento (McDOWELL, 1999; TOKARNIA, 2000). Outra dificuldade é a constante alteração na distribuição de zinco através dos compartimentos orgânicos, principalmente em resposta à fase aguda das infecções. Este efeito é mediado pela interleucina-1, que regula a transcrição da metalotioneína (proteína transportadora de Zn). Ocorre a rápida mobilização de Zn da circulação para o espaço intracelular no fígado, timo e medula óssea (KEUSCH, 1994).

TABELA 3. Médias e desvios padrões dos níveis hepáticos de zinco (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)

Grupos		C1 Mar/2000	C2 Set/2000	C3 fev/2001	Média grupos
Controle (n=10)	Média	82,42 ^{Ab}	82,60 ^{Ab}	92,13 ^{Aa}	85,72
	s	± 11,64	± 6,22	± 11,60	
-Zn (n=10)	Média	73,58 ^{Ab}	79,11 ^{Ab}	92,88 ^{Aa}	81,86
	s	± 22,26	± 3,41	± 9,55	
-Cu (n=10)	Média	83,13 ^{Ab}	80,32 ^{Ab}	95,35 ^{Aa}	82,94
	s	± 16,42	± 5,43	± 9,76	
Média momentos		79,71	80,68	90,12	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 4. Zinco hepático materno, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,33; p>0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Diferença entre grupos no conjunto dos momentos	F= 0,75; p>0,10	Não houve diferença significativa. Perfis iguais (Contr = -Zn = -Cu)
3- Diferenças entre momentos no conjunto dos grupos	F= 7,21; p<0,05	Existe efeito dos momentos. (C1=C2)<C3.

Obs: hipóteses 4 e 5 sem efeito diante do resultado das demais.

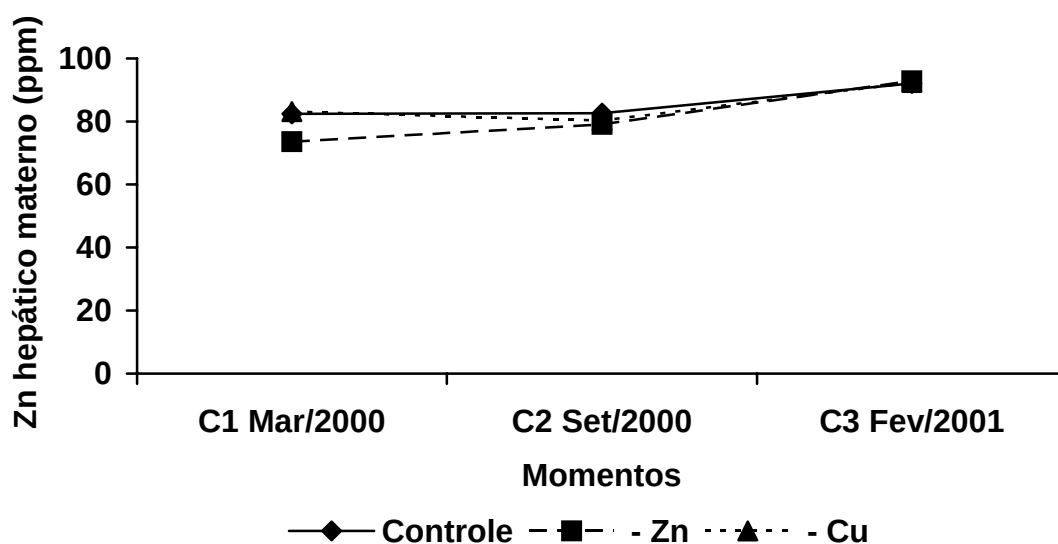


FIGURA 2. Representação gráfica das médias dos níveis hepáticos de zinco (ppm) das matrizes sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (C1 a C3)

4.3. Níveis hepáticos de cobre e zinco nos bezerros

Cobre: avaliados aos 150 dias de vida, os animais do grupo -Zn apresentaram níveis de Cu significativamente superiores (434,93 ppm) aos do grupo controle, (323,61 ppm) que, por sua vez, foram maiores do que os observados no grupo -Cu (173,30 ppm) (Tabelas 5 e 6). Cabe salientar que o elemento Zn exerce efeito antagônico à biodisponibilidade de Cu (MARSTON, 1999; McDOWELL, 1999; TOKARNIA, 2000). Assim, a menor oferta de Zn na dieta do grupo -Zn pode ter sido responsável pelos elevados níveis de Cu, observados neste grupo, explicando a ocorrência de valores superiores aos obtidos pelo grupo controle. Nos bezerros também não foram evidenciados níveis hepáticos compatíveis com deficiência pelos padrões de Underwood (1977), Graham (1991) (10 a 25 ppm), Marston (1999) (5 a 25 ppm) ou McDowell (1999) (25 a 75 ppm) em nenhum dos grupos sob diferentes tratamentos. É importante destacar que, apesar da falta de suplementação de Cu no grupo -Cu não ter ocasionado deficiência, houve diferenças significativas entre os níveis hepáticos de Cu dos grupos sob diferentes tratamentos (Tabela 6). Tal ocorrência merecia ser avaliada por um período de tempo mais prolongado, que permitisse maiores conclusões sobre os mecanismos compensatórios dos animais e sobre a eficácia dos tratamentos propostos para ocasionar deficiência marginal de Cu ou Zn.

Este dado indica que os bezerros acompanharam a tendência materna e demonstra a importância do estado nutricional materno durante a gestação para a formação das reservas hepáticas fetais, conforme já demonstrado por Kume e Tanabe (1983), Smart et al. (1983) e Xin et al. (1993) (Tabelas 4 e 6).

Suttle (1986) relata que a proporção dietética segura de Cu:Mo é variável dependendo da pastagem, sendo que McDowell (1999) considera segura a manutenção de bovinos em pastagens com 6 ppm de cobre quando os níveis de molibdênio não ultrapassam 1,5 ppm, condições estas, próximas às deste experimento (Cu: 6,0 ppm ; Mo: 2,0 ppm). Por outro lado, os elevados níveis de ferro da pastagem (153 ppm), associados à taxa de crescimento acelerada dos animais durante o período avaliado, poderiam ter contribuído de forma mais significativa para o estabelecimento de deficiência no grupo sem suplementação.

A ingestão de outras espécies de plantas, que não a *Brachiaria decumbens*, pode ter contribuído para manutenção dos teores hepáticos de

cobre. Esta possibilidade foi discutida nos experimentos de Brum et al. (1987) e Pott et al.(1989a), que não observaram níveis hepáticos de cobre compatíveis com deficiência, apesar das pastagens não suprirem as necessidades dos bovinos.

Zinco: Não houve diferenças significativas entre valores de Zn observados nas amostras colhidas dos animais dos três grupos (Controle= 79,78; -Zn= 79,20 e -Cu=80,53 ppm) (Tabelas 5 e 6).

Os valores hepáticos de zinco obtidos neste experimento apresentam-se normais quando comparados com os descritos por Graham (1991) (40 a 100 ppm). Todas as médias ficaram abaixo dos padrões de normalidade de acordo com Fick et al. (1979) (84 a 134 ppm). Segundo o critério de Underwood (1977) todas as médias, de todos os grupos, podem ser consideradas deficientes (< 125 ppm).

A comparação das médias dos três grupos não indicou diferenças significativas (Tabela 6). A discrepância dos valores hepáticos quando comparados com os níveis dietéticos, também foi observada nos estudos de Pott et al. (1989a, 1989b), Brum et al. (1987) e Borges (2001).

Os bezerros seguiram a tendência materna não apresentando diferenças significativas entre os grupos.

TABELA 5. Médias e desvios padrões dos níveis hepáticos de cobre e zinco (ppm) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e aos 150 dias de idade (M6)

Grupos		Cu hepático (ppm)	Zn hepático (ppm)
Controle (n=10)	Médias	323,61 ^B ± 26,73	79,78 ^A ± 7,08
-Zn (n=10)	Médias	434,93 ^A ± 211,56	79,20 ^A ± 4,90
-Cu (n=10)	Médias	173,30 ^C ± 51,54	80,53 ^A ± 11,11
Médias		310,62 ± 163,78	79,84 ± 7,90

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

TABELA 6. Cobre e zinco hepático dos bezerros aos 150 dias de idade (M6), hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese (Cu hepático)	Estatística (Cu hepático)	Comentário (Cu hepático)
Diferença entre grupos no M6	F= 10,75 ; p<0,05	-Zn>Contr>-Cu
Hipótese (Zn hepático)	Estatística (Zn hepático)	Comentário (Zn hepático)
Diferença entre grupos no M6	F= 0,19; p>0,50	Contr=-Zn=-Cu

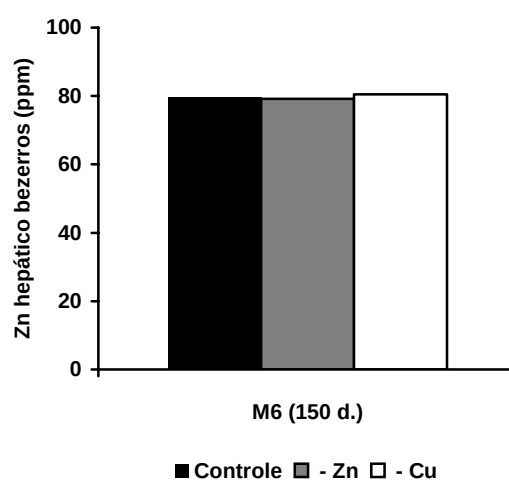
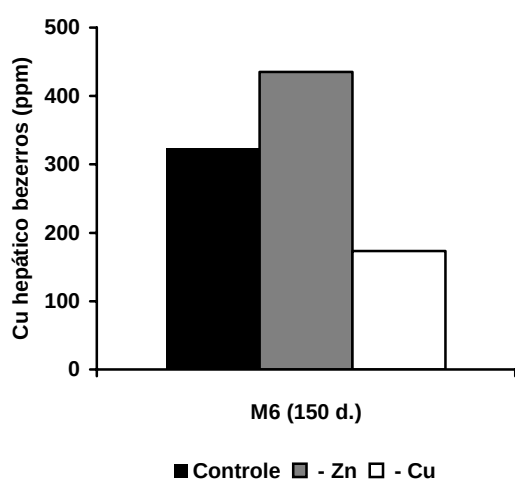


FIGURA 3 e 4. Representações gráficas das médias dos níveis hepáticos de cobre ou zinco (ppm) sob diferentes tratamentos aos 150 dias de idade (M6)

4.4 Níveis séricos de cobre nos bezerros

Não houve diferença significativa entre os valores observados nos animais dos três grupos em nenhum dos momentos de avaliação (M7, M15 e M21) (Tabelas 7 e 8).

A única ocorrência, digna de nota, foi a acentuada média obtida no material do grupo -Zn, imediatamente antes do reforço (M15) (Tabela 7).

Todas as médias das concentrações séricas de cobre, dos três grupos, com exceção da citada no parágrafo anterior, podem ser consideradas indicativas de deficiência marginal segundo Fick et al. (1979) (0,6 mg/L ou < 0,7 mg/L) e deficientes segundo McDowell (1999) (< 0,65 mg/L).

Comparando os teores de cobre hepático e sérico com os valores adequados citados por Fick et al. (1979) (hepático 100 a 300 ppm e sérico 0,7 a 1,4 mg/L) e McDowell (1999) (hepático > 75 ppm e sérico > 0,65 mg/L) observa-se que, apesar dos níveis hepáticos observados nos bezerros serem considerados adequados, os valores séricos, quando confrontados com os dados dos mesmos autores, se enquadram no intervalo de valores que caracteriza a deficiência. Este dado ilustra a baixa correlação entre os níveis hepáticos e séricos de cobre, como já citada anteriormente por Suttle (1986). Este autor apontou a ausência de correlação entre os níveis hepáticos e séricos e preconizaram a priorização dos níveis hepáticos para o diagnóstico das deficiências de cobre. Também observou teores hepáticos de cobre considerados normais em animais que apresentavam valores séricos considerados deficientes. Borges (2001) também não observou correlação positiva entre os níveis séricos e hepáticos de cobre nas novilhas Nelore, mães dos bezerros desta pesquisa.

TABELA 7. Médias e desvios padrões dos níveis séricos de cobre (ppm) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 e M21)

Grupos		M7 Antes da vacina	M15 antes do reforço	M21 15 d. após reforço	Média grupos
Controle (n=10)	Média s	0,621 ^{Aa} ± 0,112	0,642 ^{Aa} ± 0,121	0,660 ^{Aa} ± 0,181	0,641
-Zn (n=10)	Média s	0,604 ^{Ab} ± 0,110	0,809 ^{Aa} ± 0,353	0,593 ^{Ab} ± 0,161	0,669
-Cu (n=10)	Média s	0,581 ^{Aa} ± 0,085	0,600 ^{Aa} ± 0,052	0,629 ^{Aa} ± 0,104	0,603
Média momentos		0,602	0,684	0,627	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 8. Cobre sérico dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 2,58; p<0,05	Interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferença entre grupos em cada momento	M7: F= 0,39; p>0,5 M15: F= 2,58; p>0,05 M21: F= 0,50; p>0,5	M7: Contr=-Zn=-Cu M15: Contr=-Zn=-Cu M21: Contr=-Zn=-Cu
5- Diferenças entre momentos em cada grupo	Contr: F= 0,82; p>0,10 -Zn: F= 8,44; p<0,05 -Cu: F= 1,24; p>0,10	Contr: M7=M15=M21 -Zn: (M7=M21)<M15 -Cu: M7=M15=M21

Obs: hipóteses 2 e 3, sem efeito diante do resultado da primeira.

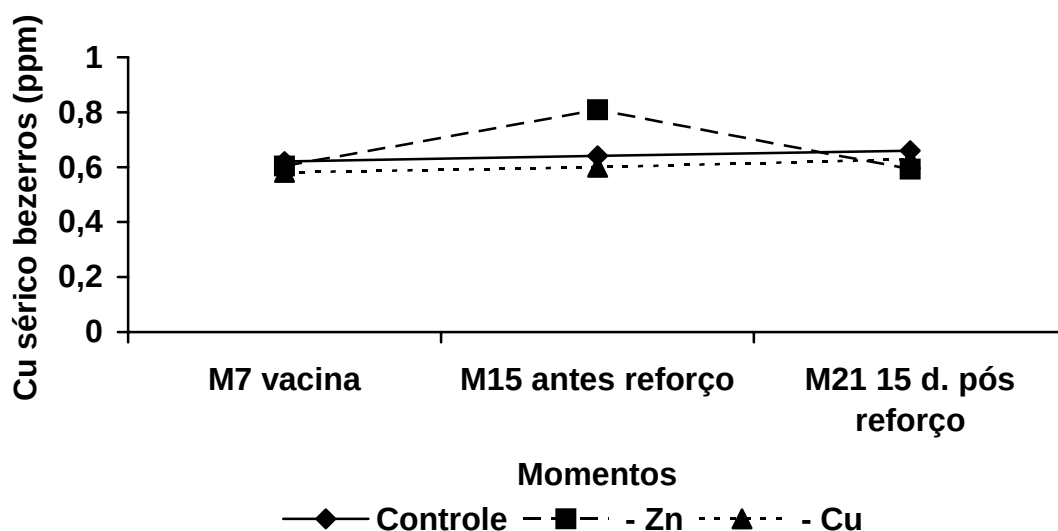


FIGURA 5. Representação gráfica das médias dos níveis séricos de cobre (ppm) dos bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 e M21)

4.5. Níveis séricos de zinco nos bezerros

Não houve diferenças significativas entre valores médios de Zn observados nas amostras colhidas dos animais dos três grupos em nenhum dos momentos (Médias dos grupos: Controle= 1,906; -Zn= 1,822; -Cu=1,606 mg/L) (Tabelas 9 e 10). Entretanto, observou-se acentuada redução entre as médias dos animais dos três grupos na última colheita (0,578 mg/L em M21, 15 dias após o reforço vacinal) em relação às duas anteriores (antes da vacina M7=2,224 e antes do reforço M15=2,532 mg/L) (tabela 10). Os níveis observados na última colheita podem ser considerados indicativos de deficiência marginal segundo o critério de Graham (1991) (0,4 a 0,8 mg/L) e Marston (1999) (0,5 a 0,6 mg/L). Tal redução pode ter ocorrido por estresse dos animais, devido ao intenso manejo durante o período final de colheitas. Este efeito do estresse sobre os níveis séricos de zinco já foi descrito por outros autores (Keusch, 1994).

Os teores séricos de zinco encontrados neste estudo estavam dentro da faixa de normalidade proposta por Fick (1979) (0,5 a 1,2 mg/L); Graham (1991) (0,8 a 1,4 mg/L); Marston (1999) (> 0,6 mg/L) e McDowell (1999) (> 0,8 mg/L).

TABELA 9. Médias e desvios padrões dos níveis séricos de zinco (ppm) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 e M21)

Grupos		M7 Antes da vacina	M15 antes do reforço	M21 15 d. após reforço	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	2,142 ^{Aa} ± 1,791	2,706 ^{Aa} ± 0,960	0,871 ^{Ab} ± 0,856	1,906 ^A
-Zn (n=10)	Médias	2,281 ^{Aa} ± 2,265	2,784 ^{Aa} ± 0,939	0,401 ^{Ab} ± 0,508	1,822 ^A
-Cu (n=10)	Médias	2,249 ^{Aa} ± 1,366	2,106 ^{Aa} ± 0,383	0,463 ^{Ab} ± 0,594	1,606 ^A
Média momentos		2,224 ^a	2,532 ^a	0,578 ^b	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 10. Zinco sérico bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 0,46; p>0,50	Não houve Interação significativa. Perfis similares.
2- Diferença entre grupos no conjunto dos momentos	F= 0,57; p>0,50	Controle=-Zn=-Cu
3- Diferenças entre momentos no conjunto dos grupos	F= 21,83; p<0,05	(M7=M15)>M21

Obs: hipóteses 4 e 5 sem efeito diante do resultado das demais.

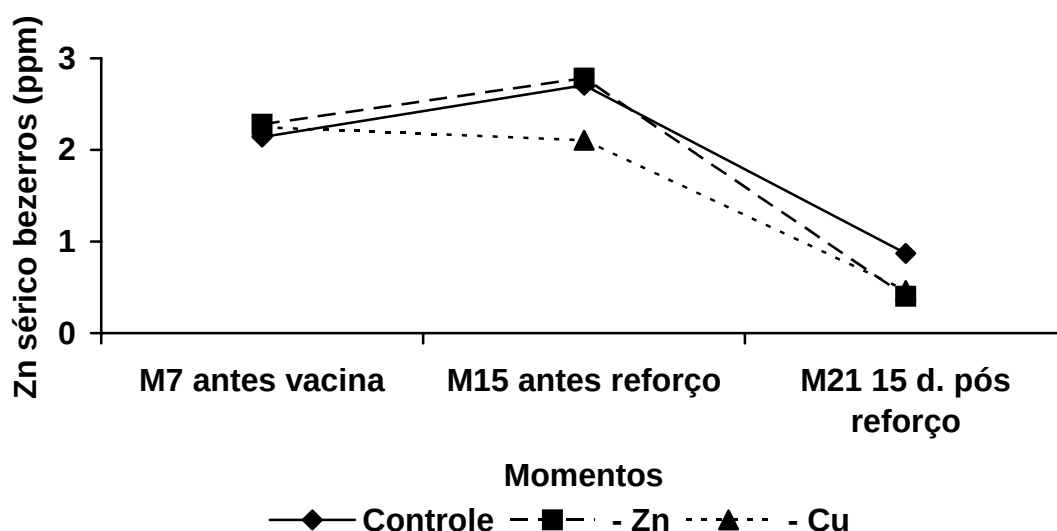


FIGURA 6. Representação gráfica das médias dos níveis séricos de zinco (ppm) dos bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7, M15 a M21)

4.6. Superóxido dismutase (SOD)

Avaliada como indicador indireto do metabolismo oxidativo dos bezerros e como um dos parâmetros para averiguar a eficiência da transmissão de micronutrientes maternos para os bezerros. Não houve diferença significativa entre as médias observadas nos diferentes grupos, na maioria dos momentos (tabelas 11 e 12). Apenas durante a primeira colheita se evidenciou média mais elevada de SOD no grupo controle (Tabela 11). Entretanto, esta média elevada deveu-se à presença de valores individuais discrepantes, que elevaram a média durante este momento (Tabela 11). Cabe salientar que os níveis de SOD observados foram compatíveis com valores considerados adequados por Xin et al. (1985). A SOD eritrocitária quantificada neste trabalho não se compõe apenas pela fração Cu/Zn-SOD, mas também pela Mn-SOD. Assim, outros micronutrientes além do Cu e do Zn estão relacionados direta ou indiretamente aos níveis desta enzima.

A não ocorrência de decréscimo nos níveis de SOD também ocorreu nos experimentos de Ward et al. (1993); Niederman et al. (1994); Torre et al. (1995) e ainda no experimento conduzido por Dorton et al. (2003). Assim como no presente experimento, os pesquisadores anteriormente mencionados também atribuíram este achado à inexistência de níveis hepáticos de Cu, compatíveis com deficiência.

Segundo Minatel e Carfagnini (2000) a SOD eritrocitária é uma das últimas enzimas a sofrer algum decréscimo de atividade em função dos níveis de Cu.

Xin et al. (1993) correlacionaram a redução dos níveis de SOD eritrocitária apenas à períodos prolongados de deficiência de Cu. Entretanto, quando dietas semipurificadas, com baixos níveis de Cu, foram utilizadas em outros estudos, ocorreu a significativa redução da atividade da SOD eritrocitária em relação aos animais suplementados com Cu (ANDREWARTHA E CAPLE, 1980; JONES E SUTTLE, 1981; XIN ET AL., 1991).

TABELA 11. Médias e desvios padrões da concentração de superóxido dismutase (SOD U/g Hb) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M1 a M6)

Grupos		M1 Até 1 sem	M2 1 mês	M3 2 meses	M4 3 meses.	M5 4 meses	M6 5 meses	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	6888,5 ^{Aa} ± 1819,1	3541,7 ^{Ac} ± 1009,5	3248,8 ^{Ac} ± 944,0	3173,9 ^{Ac} ± 545,4	3927,1 ^{Ab} ± 950,8	3342,7 ^{Ac} ± 748,1	4020,5
-Zn (n=10)	Médias	4475,7 ^{Ba} ± 933,8	3322,2 ^{Ac} ± 847,7	2814,4 ^{Ac} ± 342,9	3454,5 ^{Ac} ± 577,5	3865,9 ^{Ab} ± 1662,8	3619,6 ^{Ac} ± 993,8	3592,1
-Cu (n=10)	Médias	4314,7 ^{Ba} ± 1468,2	3079,2 ^{Ac} ± 466,5	2743,8 ^{Ac} ± 342,8	3071,7 ^{Ac} ± 304,7	3406,2 ^{Ab} ± 665,3	3309,0 ^{Ac} ± 588,4	3320,8
Média momentos		4458,3	3005,6	2645,4	3279,5	3582,6	3363,1	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 12. Concentração de superóxido dismutase (SOD U/g Hb) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 3,33; p <0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M1: F= 12,28; p<0,05 M3: F= 2,80; p>0,05 M5: F= 0,66; p>0,50 M2: F= 1,20; p>0,10 M4: F= 1,62; p>0,10 M6: F= 0,43; p>0,50	M1: Controle>(-Zn=-Cu) M2 a M6: Contr=-Zn=-Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	M1: F= 44,64; p<0,05 M2: F= 11,37; p<0,05 M3: F= 7,70; p<0,05	Contr: B1>(B2=B5)>(B3=B4=B6) -Zn: (M1=M2=M4=M5=M6)>B3 -Cu: B1>B3 (M2=M4=M5=M6)

Obs: hipóteses 2 e 3 perderam o efeito diante do resultado das demais.

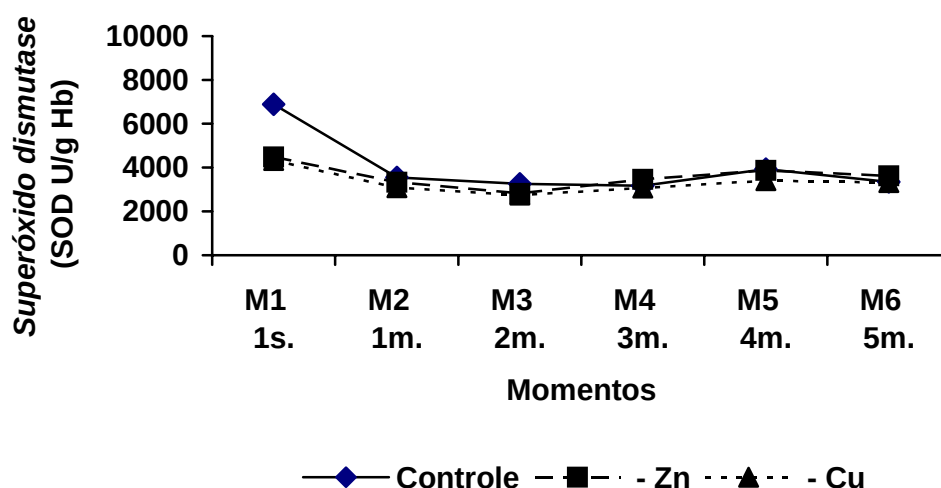


FIGURA 7. Representação gráfica da concentração de superóxido dismutase (SOD U/g Hb) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M1 a M6)

4.7. Índice ELISA Anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* (passivos/colostral)

Não houve diferença significativa entre os níveis de anticorpos anti-*C chauvoei* dos distintos grupos nos diferentes momentos de avaliação (Tabelas 13 e 14). Nota-se a redução seqüencial e significativa dos títulos de anticorpos até o quarto mês de idade dos bezerros, sendo bastante acentuada nos primeiros dois meses de vida (Tabela 14). O objetivo destas avaliações foi verificar se os bezerros receberam ou absorveram quantidades diferentes de anticorpos maternos. Também se objetivou checar a ocorrência eventual de contato com antígenos de *C chauvoei* que pudessem ter ocasionado resposta humoral nestes animais, antes deles receberem a primeira dose da vacina. Nota-se, pelo decréscimo constante dos títulos de anticorpos, que não houve estimulação antigênica que levasse à produção de anticorpos pelos bezerros.

Deve-se correlacionar a ausência de diferenças significativas entre os níveis de anticorpos colostrais dos três grupos com os níveis de Cu e Zn das matrizes (Tabelas 1, 2, 3, 4, 13 e 14). Apesar das diferenças significativas observadas entre os teores de Cu nos diferentes grupos de matrizes, todas as médias hepáticas de Cu estiveram muito acima dos níveis indicativos de deficiência (5 a 25 ppm, conforme Marston (1999) e 10 a 25 ppm por Graham (1999)) (Tabelas 1 e 2). Além disto, os níveis hepáticos de zinco, apesar de estarem um pouco abaixo dos valores considerados adequados por Fick et al. (1979), estão dentro do padrão de normalidade proposto por Graham (1991), bem acima dos níveis indicativos de deficiência marginal (25 a 40 ppm) (Tabela 3). Assim, pode-se considerar que as matrizes utilizadas neste experimento, mesmo as submetidas a dietas insuficientes em Cu e Zn, mantiveram estoques hepáticos destes nutrientes, que permitiram a produção adequada de imunoglobulinas.

TABELA 13. Médias e desvios padrões do índice ELISA para os anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* (passivos) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M1 a M6)

Grupos		M1 Até 1 sem	M2 1 mês	M3 2 meses	M4 3 meses.	M5 4 meses	M6 5 meses	Média grupos
Controle (n=10)	Média s	1,018 ^{Aa} ± 0,360	0,452 ^{Ab} ± 0,351	0,116 ^{Ac} ± 0,115	0,080 ^{Ad} ± 0,073	0,016 ^{Ae} ± 0,020	0,012 ^{Ae} ± 0,038	0,282 ^A
-Zn (n=10)	Média s	0,962 ^{Aa} ± 0,418	0,358 ^{Ab} ± 0,139	0,065 ^{Ac} ± 0,048	0,031 ^{Ad} ± 0,029	0,015 ^{Ae} ± 0,025	0,014 ^{Ae} ± 0,030	0,240 ^A
-Cu (n=10)	Média s	1,019 ^{Aa} ± 0,413	0,332 ^{Ab} ± 0,238	0,111 ^{Ac} ± 0,187	0,089 ^{Ad} ± 0,105	0,022 ^{Ae} ± 0,050	0,019 ^{Ae} ± 0,046	0,265 ^A
Média momentos		0,999 ^a	0,380 ^b	0,097 ^c	0,066 ^d	0,018 ^e	0,015 ^e	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 14. Índice ELISA para os Ac. anti-*Clostridium chauvoei* (passivos) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,33; p>0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Diferença entre grupos no conjunto dos momentos	F= 0,75; p>0,10	Não houve diferença significativa. Perfis iguais (Controle=-Zn=-Cu)
3- Diferenças entre momentos no conjunto dos grupos	F= 7,21; p<0,05	Existe efeito dos momentos. M1>M2>M3>M4>(M5=M6).

Obs: hipóteses 2 e 3 perderam o efeito diante do resultado das demais.

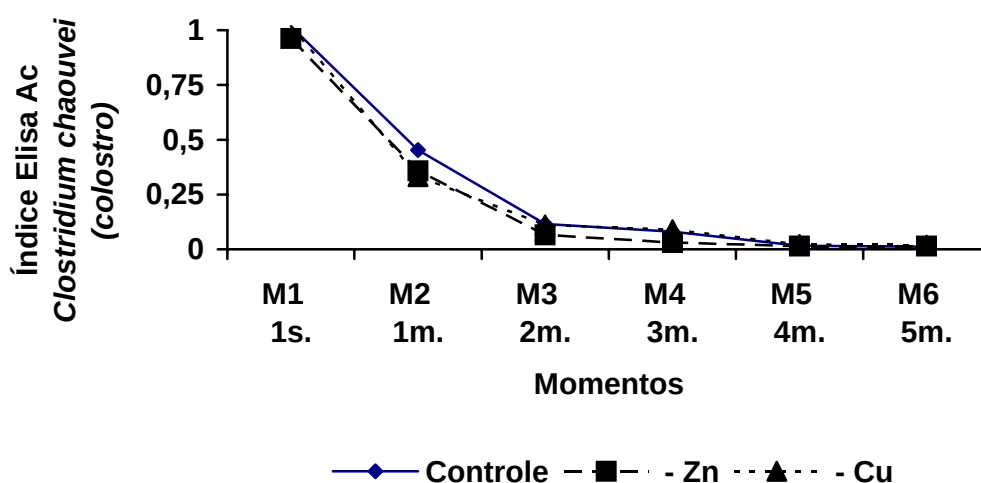


FIGURA 8. Representação gráfica das médias do índice ELISA para os anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* (colostrais) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M0, M6, M7, M8 e M14)

4.8. Índice ELISA Anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* (vacina)

Nota-se que o grupo -Cu, que detinha os menores níveis hepáticos de Cu apresentou os menores títulos de anticorpos 15 dias após a vacinação (M13), não havendo diferenças entre o grupo Controle e o grupo -Zn, detentor dos maiores níveis hepáticos de Cu aos 150 dias de vida (M6) (Tabelas 15 e 16). Além disto, aos 21 dias após a vacinação (M14) os títulos do grupo Controle estavam significativamente mais elevados do que os observados nos grupos -Zn e -Cu, mostrando a maior competência dos animais em dieta adequada para a produção de anticorpos (Tabelas 15 e 16). Aos trinta e seis dias após a primeira vacinação e imediatamente antes da segunda dose (M15), os títulos de anticorpos dos animais de todos os grupos estavam estatisticamente semelhantes. Entretanto, 15 dias após o reforço vacinal (M21) pôde-se constatar, mais uma vez, a diferença entre os títulos de anticorpos dos três grupos de animais. O grupo controle apresentou os maiores títulos, seguido pelo grupo -Zn, composto por animais alimentados com níveis insuficientes de Zn (Tabela 16). Os animais do grupo -Cu, cuja dieta continha níveis insuficientes de Cu, e por conseqüência, apresentaram os menores níveis hepáticos do mineral, apresentaram também os menores títulos de anticorpos anti-*C. chauvoei* neste momento de avaliação (Tabela 5 e 6).

Considerando a ausência de diferenças significativas entre os níveis séricos de Zn, dos animais dos três grupos experimentais em todos os momentos avaliados (Tabelas 5 e 6), tais observações devem ser analisadas considerando-se as diferenças nos níveis de Cu. Cabe salientar que, apesar das diferenças significativas entre os teores hepáticos de Cu dos bezerros, nenhuma das médias esteve próxima de valores indicativos de deficiência (Tabela 5 e 6).

Nota-se que a última colheita após o reforço da vacina (M21) foi efetuada 15 dias após sua administração e não aos 21 dias como na primeira aplicação de vacina. Esta decisão baseou-se no fato de que as respostas imunológicas ao reforço de vacinal desenvolvem-se de maneira distinta, produzindo uma grande quantidade de anticorpos num espaço de tempo mais curto.

Diferentes autores investigaram o efeito da deficiência de Cu sobre a resposta imune humoral de bovinos e obtiveram resultados variados. Stabel et al. (1993) observaram títulos de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV), mais elevados em bezerros que receberam nutrição insuficiente

em Cu do que naqueles que receberam suplementação do referido elemento. Nesse mesmo experimento, os autores não encontraram diferenças significativas entre os títulos de anticorpos contra *Pasteurella haemolytica* em bezerros sob nutrição insuficiente ou suplementada em Cu. Entretanto, os bezerros suplementados com Cu apresentaram tendência aos maiores títulos de anticorpos anti-*Pasteurella haemolytica*, quando comparados aos obtidos pelos animais sem suplementação. Esse estudo, de cinco meses de duração, foi conduzido com 14 novilhas da raça Holandesa com aproximadamente 30 dias de idade, submetidas à uma dieta insuficiente em Cu (1.5 ppm), ou suplementada com 10 ppm deste mineral. Os níveis hepáticos de Cu dos animais que receberam suplementação deste elemento (61 ± 23 ppm) foram significativamente superiores aos dos animais sob nutrição insuficiente ($7,4 \pm 2,5$ ppm). Esses níveis hepáticos de Cu são muito menores que os obtidos nesta presente pesquisa, tornando difícil a comparação direta entre os resultados. Nota-se a presença de níveis hepáticos de Cu indicativos de deficiência, conforme as referências de Graham (1991) (< 10 ppm) e Marston (1999) (0.5-10 ppm). Segundo Mc Dowell (1999) (25-75 ppm), até mesmo os grupos que receberam suplementação de Cu apresentaram níveis hepáticos indicativos de deficiência.

Ward et al. (1997) conduziram experimentação para determinar o efeito da deficiência de Cu, com ou sem a presença de altos níveis nutricionais de Mo ou Fe, sobre a imunidade específica de bezerros. Estes autores utilizaram 38 bezerros, nascidos de vacas mantidas sob dietas experimentais controladas, desde o último terço da gestação até o desmame de suas crias. Dietas não suplementadas com Cu resultaram em níveis plasmáticos indicativos de deficiência, de acordo com os padrões de Underwood (1981) ($< 0,5$ mg/L). Bezerros que não receberam suplementação de Cu (0,30 mg/L de Cu plasmático) obtiveram títulos de anticorpos, em resposta à segunda inoculação de PRBC, significativamente mais elevados do que os grupos suplementados com Cu, Mo e Fe aos 14 e 21 dias após a inoculação (respectivamente 0.68 mg/L, 0.35 mg/L and 0.22 mg/L de Cu plasmático). Não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos dos diferentes grupos na primeira inoculação. A dieta basal continha 1.5 ppm de Cu e os grupos foram suplementados com 10 ppm de Cu; 5 ppm de Zn e 600 ppm de Fe.

Cerone et al. (1995) alimentaram novilhas da raça Aberdeen Angus com uma dieta contendo excesso de Mo e S por nove meses com o objetivo de induzir deficiência de Cu. Estas novilhas foram então vacinadas com a cepa viva S1119 de *Brucella abortus*. Em resposta, estes autores observaram redução dos níveis séricos de cobre (aproximadamente 0,4 mg/L de Cu sérico, quatro meses após o início das dietas do experimento) e da atividade da ceruloplasmina. Níveis séricos totais de imunoglobulina G e complemento também foram reduzidos pelos baixos níveis orgânicos de Cu, quando comparados aos do grupo controle. Títulos de anticorpos contra *Brucella abortus* e proliferação de células mononucleares periféricas em resposta à Concanavalina A foram significativamente menores nas bezerras deficientes em cobre do que no grupo controle. Seguindo a mesma linha, Cerone et al. (1998) observaram redução da capacidade dos neutrófilos em reduzir nitroblue tetrazólium - NBT e fagocitar eritrócitos ovinos em bovinos com deficiência de cobre secundária, induzida por molibdênio e enxofre. Também foi encontrada redução significativa do número de linfócitos B, sem redução da contagem total de linfócitos e 50% de decréscimo nos níveis de ceruloplasmina dos animais deficientes, quando comparados aos do grupo controle.

Estes dois autores previamente mencionados utilizaram apenas níveis plasmáticos ou séricos como indicadores do estado nutricional de Cu. Além disto, utilizaram antagonistas de Cu para induzir deficiência. Sabe-se que a deficiência secundária de Cu, induzida pelo excesso de antagonistas, costuma ocasionar sintomas mais graves. Estes pontos são diferentes da metodologia adotada nesta presente pesquisa e podem ter influenciado adversamente a interpretação dos resultados daqueles trabalhos.

Dorton et al. (2003) utilizaram 48 novilhas da raça Aberdeen Angus, com aproximadamente 7 meses de idade, para determinar os efeitos das fontes de Cu e suas concentrações sobre a resposta imune. As novilhas receberam dieta contendo 7.1 ppm de Cu por 56 dias e depois, por mais 144 dias, receberam dieta com 6.1 ppm de Cu. Os grupos que receberam dieta suplementada com 10 ppm de Cu obtiveram, aos 14 dias após a inoculação de PRBC, títulos mais elevados de anticorpos do que os grupos que receberam suplementação com 20 ppm de Cu. Aos 14 dias após a segunda inoculação de PRBC os grupos suplementados com 20 ppm de Cu obtiveram títulos mais elevados do que os obtidos pelos grupos suplementados com 10 ppm deste mineral e animais não suplementados.

Entretanto, 21 dias após a segunda inoculação de PRBC os títulos de anticorpos obtidos pelos animais não suplementados foram superiores aos observados nos grupos suplementados. Por outro lado, resultados diferentes foram observados com a inoculação de ovalbumina (OVA) nos animais. Aos 14 e 21 dias após a inoculação de OVA, as novilhas que receberam 20 ppm de Cu obtiveram títulos mais elevados de anticorpo do que os animais que receberam 10 ppm deste mineral. Novilhas que receberam 20 ppm de Cu, de fontes orgânicas, obtiveram maiores títulos de anticorpo do que as que receberam o mesmo teor deste mineral, oriundo de fontes inorgânicas (sulfato de cobre). As novilhas que não receberam suplementação obtiveram os títulos de anticorpos mais baixos. Aos 112 dias do experimento, quando os animais receberam a segunda dose de PRBC e a única de OVA, os grupos estavam com os seguintes níveis hepático de Cu: grupo sem suplementação - 37,4 ppm (deficiência marginal conforme Mc Dowell (1999) (25-75 ppm); grupo 10 ppm de Cu - 113,9 ppm; grupo 20 ppm de Cu - 116,9; grupo 10 ppm de Cu (fontes orgânicas) – 94,8 ppm e grupo 20 ppm de Cu (fontes orgânicas): 194,6 9 (adequado conforme Underwood (19991); Marston (1999); Mc Dowell (1999)). Para estes autores, os efeitos da suplementação de Cu sobre a resposta imune dos animais são variados e dependem da classe de célula imune que está sob estudo, assim como da fonte e concentração de Cu suplementar. Células B tendem a aumentar a resposta imune primária ou secundária em resposta à suplementação. Quando um antígeno com grande capacidade antigênica é administrado, a maior suplementação de Cu, resulta em títulos mais elevados. Os autores também mencionaram que as diferenças entre os resultados obtidos por vários pesquisadores se deve à influência do tipo de estimulação antigênica. Nesse caso, os autores atribuíram importância ao uso do “adjuvante completo de Freund” para aumentar o estímulo antigênico da OVA, induzindo formação de granuloma, melhor processamento do antígeno e apresentação para células T.

Nesta presente pesquisa, não houve níveis de Cu indicativos de deficiência. Entretanto, o grupo –Cu, com níveis de hepáticos de Cu significativamente menores, também apresentou títulos de anticorpos significativamente inferiores aos dos outros grupos. Embora os níveis hepáticos de Cu do grupo –Zn tenham sido os mais elevados, os títulos de anticorpos deste grupo foram significativamente inferiores aos obtidos pelo grupo Controle, em

nutrição adequada (Tabelas 5 e 6). Estes resultados indicam a vantagem da nutrição mineral adequada e bem balanceada em todos os nutrientes, para prevenir disfunções imunológicas. É importante mencionar que os níveis de Cu hepático, observados neste presente estudo, até mesmo nos animais sob nutrição insuficiente foram superiores (173.30 ± 51.54 ppm) às referências de Mc Dowell (1999) (27 – 75 ppm), Marston (1999) (5 – 25 ppm) e Graham (1991) (10 – 25 ppm) para deficiência marginal. Neste sentido, os altos níveis de hepáticos de Cu alcançados pelos animais do grupo –Zn, possivelmente pela falta do elemento antagonista Zn, podem ter ocasionado algum efeito negativo à produção de anticorpos (Tabelas 5 e 6). Os altos níveis de Cu podem ter reduzido a biodisponibilidade de outros minerais, tais como Se e Mn, também importantes para a resposta imune dos bovinos (Tabelas 5 e 6). Cabe salientar que outros pesquisadores observaram menores títulos de anticorpos em grupos de bovinos suplementados com Cu, em comparação com outros sob nutrição insuficiente em Cu e até mesmo em animais deficientes. Além disto, é importante ressaltar que os teores teciduais de Cu e Zn obtidos nesta pesquisa não foram induzidos por suplementação com elevados níveis de elementos antagonistas. Estas condições, somadas às diferenças raciais, tornam difícil a comparação direta entre os resultados obtidos por outros pesquisadores.

TABELA 15. Médias e desvios padrões do índice ELISA para anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* em resposta à vacinação dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

Grupos		M7 antes	M13 15 dias	M14 21 dias	M15 Reforço	M21 15 dias pós	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	0,028 ^{Ad} ± 0,044	0,949 ^{Aa} ± 0,248	0,858 ^{Ab} ± 0,234	0,580 ^{Ac} ± 0,194	0,827 ^{Ab} ± 0,200	0,648
-Zn (n=10)	Médias	0,047 ^{Ad} ± 0,054	0,924 ^{Aa} ± 0,300	0,696 ^{Bb} ± 0,279	0,538 ^{Ac} ± 0,270	0,733 ^{Bb} ± 0,242	0,587
-Cu (n=10)	Médias	0,020 ^{Ad} ± 0,027	0,829 ^{Ba} ± 0,350	0,726 ^{Bb} ± 0,333	0,578 ^{Ac} ± 0,264	0,679 ^{Cb} ± 0,201	0,566
Média momentos		0,030	0,901	0,760	0,565	0,746	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.
Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 16. Índice ELISA para os anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* (vacina) dos bezerros, hipóteses, estatística e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,96; p <0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M7: F= 1,72; p>0,10 M13: F= 0,56; p>0,50 M14: F= 0,90; p>0,10 M15: F= 1,00; p>0,10 M21: F= 1,08; p>0,10	M7: Contr=-Zn=-Cu M15: Contr=-Zn=-Cu M13: (Contr=-Zn)>-Cu M21: Contr>-Zn>-Cu M14: Contr>(-Zn=-Cu)
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	G1: F= 7,28; p<0,05 G2: F= 19,92; p<0,05 G3: F= 14,07; p<0,05	Contr: M13>(M14=M21)>M15>M7 -Zn: M13>(M14=M21)>M15>M7 -Cu: M13>(M14=M21)>M15>M7

Obs: hipóteses 2 e 3 perderam o efeito diante do resultado das demais.

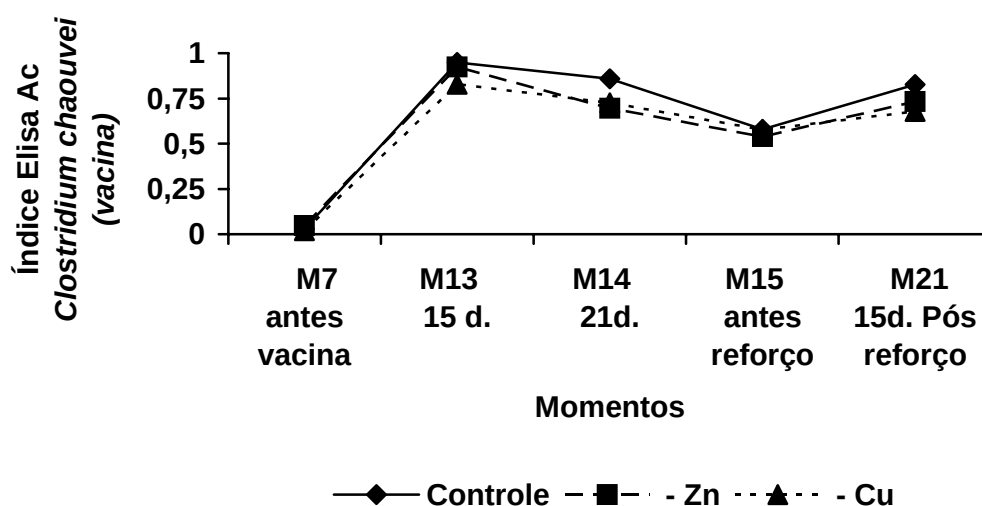


FIGURA 9. Representação gráfica das médias do índice ELISA para os anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* (vacina) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

4.9. Hemograma

Serão comentadas as diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos para as variáveis do hemograma em que tal efeito foi observado. Todos os resultados, bem como a respectiva análise estatística estão dispostos nas tabelas dispostas em seguimento.

Volume globular: foram observadas diferenças significativas entre as médias do VG dos diferentes grupos, imediatamente antes do reforço vacinal e também aos dois e três dias após o reforço vacinal (M15, M18 e M19) (Tabelas 19 e 20). Nestes momentos os valores obtidos pelos animais do grupo -Cu foram os mais elevados. Apesar das médias de VG do grupo -Cu já estarem mais elevadas durante o momento imediatamente anterior ao reforço vacinal (M15), tal ocorrência, relacionada à hemoconcentração, pode significar certo efeito dos níveis de Cu sobre a resposta à fase aguda das infecções e/ou estresse (manejo excessivo dos animais durante as colheitas) (COLES, 1986; JAIN, 1991). A hemoconcentração por estresse pode ser correlacionada à liberação de hormônios adrenocorticóides. Sendo assim, poderia haver ligação mais evidente com os níveis orgânicos de Zn. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os níveis hepáticos ou séricos dos diferentes grupos em nenhum dos momentos de avaliação.

Fibrinogênio: possivelmente as diferenças entre as médias dos grupos observadas em M1 e M2 não detêm relevância biológica. Imediatamente antes da vacina (M7), as médias do grupo -Cu estiveram mais elevadas do que as dos outros grupos (devido a 4 animais que apresentaram valores acentuados), porém, apenas oito horas após (M8), as médias do grupo -Cu foram as menores (Tabelas 25 e 26).

Leucócitos, neutrófilos e monócitos: verificou-se que as médias do número de leucócitos do grupo -Cu foram menores do que as do grupo -Zn durante todos os momentos relacionados ao reforço vacinal (M15 a M21). Nota-se também que as maiores contagens de leucócitos foram obtidas um dia após o reforço vacinal (M17) em todos os grupos (tabelas 31 e 32).

Para os neutrófilos, verificou-se que das oito até as 48 hs após o reforço vacinal (M16, M17 e M18) o grupo -Cu obteve menores médias do que o grupo -

Zn. Tal tendência repetiu-se na contagem dos monócitos. As médias do grupo -Cu foram inferiores às do grupo -Zn, dois dias após o reforço vacinal (M18) e novamente, aos 15 dias depois do reforço vacinal (M21). Nota-se que dois dias após o reforço vacinal foram obtidas as maiores médias desta variável em todos os grupos (Tabelas 35 e 36).

Cerone et al. (1998) estudaram os efeitos da deficiência induzida de Cu sobre as células do sangue periférico de seis bezerras da raça Aberdeen Angus (5 meses) suplementadas com 30 ppm de Mo e 225 ppm de S. A deficiência secundária de Cu foi constatada por níveis séricos abaixo de 5,9 Umol/L. Ao contrário deste presente trabalho, o número total de leucócitos, das bezerras estudadas por Cerone et al. (1998) não foi afetado pela deficiência de Cu. Entretanto, a contagem diferencial revelou o significativo aumento do número de monócitos e redução, também significativa, do número de linfócitos B. Não houve alteração significativa do número de neutrófilos, entretanto, ocorreu redução da atividade destes polimorfonucleares, caracterizada pelo decréscimo na capacidade de redução do corante nitroblue tetrazolium – NBT e fagocitose de eritrócitos ovinos. Os achados de Cerone et al. (1998) em relação aos monócitos e neutrófilos diferiram desta presente pesquisa, em que os animais com menores níveis de Cu, do grupo -Cu, apresentaram em alguns momentos, as menores contagens de neutrófilos e monócitos. A deficiência de Cu induzida por excesso de Mo e S, assim como a falta de mensuração dos teores hepáticos de Cu, dificultam a comparação entre os resultados das duas pesquisas.

Randhawa et al. (2002) avaliaram os níveis de hemoglobina, hematócrito e contagem total e diferencial do número de leucócitos de oito bezerros bubalinos com deficiência de Cu induzida pela adição de 30 ppm de Mo às suas dietas. Diferente desta presente pesquisa, a contagem total dos leucócitos não foi afetada pela deficiência secundária de Cu nos bezerros estudados por Randhawa et al. (2002). Porém, ocorreu redução significativa do número de neutrófilos. Tal redução coincidiu com o decréscimo dos níveis hepáticos de Cu para 23.9 ± 2.69 ppm. A redução do número de neutrófilos não foi acompanhada por variações na proporção das suas diferentes células precursoras na medula óssea. Os autores concluíram que a neutropenia ocasionada pela deficiência de Cu, induzida por excesso de Mo, não estaria relacionada à efeito sobre a síntese ou maturação

medular de tais células. Em pacientes humanos com deficiência de Cu a neutropenia é um achado comum (WILLIAMS, 1983; PERCIVAL, 1995).

Cabe salientar que as altas médias do número de linfócitos obtidas neste presente trabalho (Tabelas 29 e 30) podem ser consideradas dentro dos valores normais para animais entre 6 a 12 meses da raça Nelore ($16,99 \pm 4,10 \times 10^3/\mu\text{L}$), conforme Costa (2000). Este pesquisador, estudou a influência de fatores etários em bovinos Nelore e concluiu que animais mais jovens detêm maiores contagens de leucócitos e que o avanço da idade contribui significativamente para a redução do número de leucócitos.

Eosinófilos e Basófilos: As médias dos números de eosinófilos do grupo -Cu foram mais elevadas que as dos outros grupos aos oito e 48 horas após o reforço vacinal (M16 e 18) (Tabelas 46 e 47).

No que se refere aos basófilos, as médias mais elevadas do grupo -Zn, registradas aos 15 dias após a vacina (M13) e também às 72 horas após o reforço vacinal, se devem a valores individuais e não detêm relevância biológica (Tabelas 50 e 51).

Apesar de não terem sido observadas concentrações hepáticas de Cu compatíveis com deficiência, as diferenças entre as médias dos diferentes grupos refletiram-se nas contagens de algumas variáveis do hemograma. Tal achado não pode ser interpretado apenas estatisticamente. O fato das diferenças entre os grupos se manifestarem apenas em alguns momentos isolados pode significar a menor relevância biológica do efeito. Entretanto, como os níveis de Cu dos animais deste experimento não foram compatíveis com deficiência e apesar disto, provocaram algum efeito sobre as variáveis do hemograma, os achados indicam a necessidade de estudar mais os efeitos de níveis de Cu sobre as variáveis do hemograma dos bovinos. A falta de informações na literatura a respeito do efeito dos níveis de Cu sobre as variáveis do hemograma dificulta a interpretação dos achados.

4.9.1. Volume Globular

TABELA 17. Médias e desvios padrões do volume globular (%) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M0 a M7)

Grupos	M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Control (n=10)	Média 38,40 ^{Aab} s ± 2,84	38,50 ^{Aab} ± 2,88	38,50 ^{Aa} ± 2,88	36,50 ^{Ab} ± 2,17	36,00 ^{Ab} ± 3,23	37,30 ^{Ab} ± 2,95	36,20 ^{Ab} ± 3,99	38,80 ^{Aab} ± 4,89	37,53 ^A
-Zn (n=10)	Média 36,60 ^{Aab} s ± 2,17	36,10 ^{Aab} ± 2,18	37,90 ^{Aa} ± 2,38	36,00 ^{Ab} ± 2,11	35,20 ^{Ab} ± 2,30	35,70 ^{Ab} ± 2,16	35,90 ^{Ab} ± 2,69	35,70 ^{Aab} ± 2,21	36,14 ^A
-Cu (n=10)	Média 38,50 ^{Aab} s ± 3,75	37,60 ^{Aab} ± 2,76	39,20 ^{Aa} ± 3,16	37,40 ^{Ab} ± 3,78	36,20 ^{Ab} ± 3,05	36,00 ^{Ab} ± 1,76	36,00 ^{Ab} ± 3,33	38,90 ^{Aab} ± 2,85	37,48 ^A
Média momentos	37,83 ^{ab}	37,40 ^{cb}	38,53 ^a	36,63 ^b	35,80 ^b	36,33 ^b	36,33 ^b	37,8 ^{ab}	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 18. Volume globular (%) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,58; p>0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F= 0,98; p>0,10	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F= 11,00; p<0,05	Houve efeito significativo M9>(M10=M11= M12=M13) (M7=M8=M14 intermediários)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

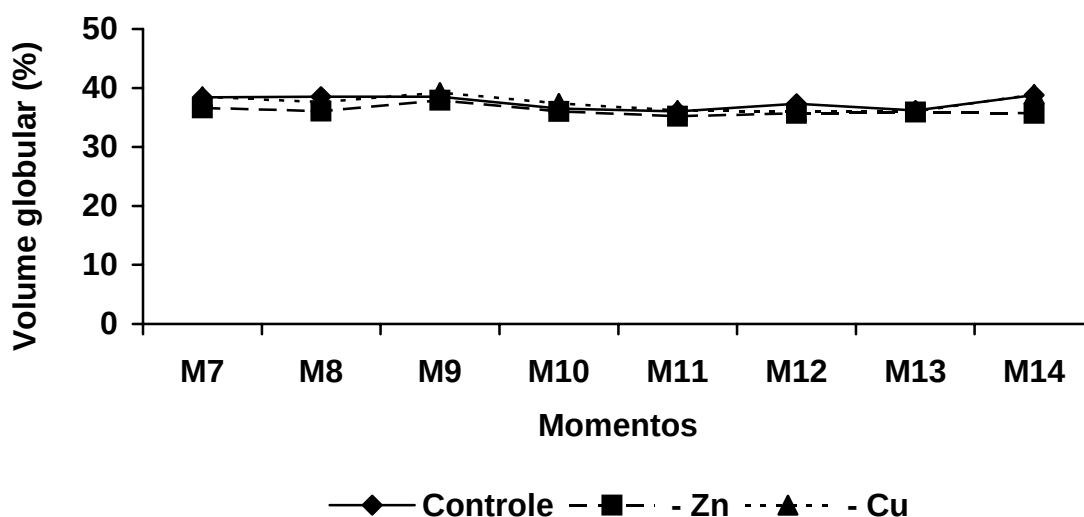


FIGURA 10. Representação gráfica das médias do volume globular (%) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.2. Volume Globular (reforço vacinal)

TABELA 19. Médias e desvios padrões do volume globular (%) ao reforço vacinal dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=11)	Médias	37,7 ^{ABa} ± 2,31	39,7 ^{Aa} ± 3,06	38,7 ^{Aa} ± 2,41	33,9 ^{Bb} ± 1,91	35,2 ^{Bb} ± 1,69	35,8 ^{Ab} ± 2,66	37,3 ^{Aa} ± 1,83	36,90
-Zn (n=11)	Médias	35,4 ^{Ba} ± 5,87	38,5 ^{Aa} ± 1,58	37,6 ^{Aa} ± 1,71	35,2 ^{ABb} ± 3,19	34,5 ^{Bb} ± 2,01	34,8 ^{Ab} ± 2,53	36,8 ^{Aa} ± 3,12	36,11
-Cu (n=11)	Médias	40,5 ^{Ab} ± 2,46	39,1 ^{Aa} ± 2,18	38,5 ^{Aab} ± 2,32	37,3 ^{Ab} ± 2,31	37,2 ^{Ab} ± 1,81	37,1 ^{Ab} ± 2,73	38,5 ^{Aab} ± 3,79	38,31
Média momentos		37,87	39,1	38,27	35,47	35,63	35,90	37,53	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 20. Volume globular (%) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 2,41; p <0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M15: F= 4,26; p<0,05 M17: F= 0,73; p>0,10 M19: F= 5,78; p<0,05 M21: F= 0,84; p>0,10 M16: F= 0,65; p>0,10 M18: F= 4,60; p<0,05 M20: F= 1,91; p>0,10	M15: -Zn<-Cu (Contr intermediário) M16, M17, M20 e M21: Contr=-Zn=-Cu M18: Contr<-Cu (-Zn intermediário) M19: (Contr=-Zn)<-Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F= 32,95; p<0,05 -Zn: F= 24,75; p<0,05 -Cu: F= 9,95; p<0,05	Contr: (M15=M16=M17=M18)>(M19=M20=M21) -Zn: (M15=M16=M17=M21)>(M18=M19=M20) -Cu: M16>(M15=M18=M19=M20) (M17=M21 intermediários)

Obs: hipóteses 2 e 3 perderam o efeito diante do resultado das demais.

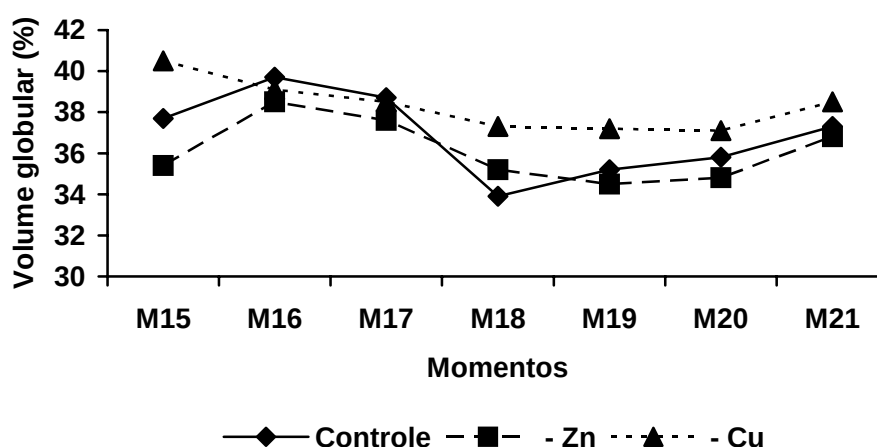


FIGURA 11. Representação gráfica das médias do volume globular (%) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.3 Proteína Total

TABELA 21. Médias e desvios padrões da concentração plasmática de proteína total (g/dL) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Control (n=10)	Média	6,62 ^{Aa}	6,88 ^{Aa}	6,69 ^{Aa}	7,09 ^{Aa}	6,75 ^{Aa}	6,98 ^{Aa}	6,65 ^{Aa}	7,06 ^{Aa}	6,84
	s	± 0,33	± 0,42	± 0,41	± 0,42	± 0,34	± 0,24	± 0,32	± 0,33	
-Zn (n=10)	Média	6,58 ^{Aa}	6,82 ^{Aa}	6,53 ^{Aa}	7,13 ^{Aa}	6,73 ^{Aa}	6,86 ^{Aa}	6,79 ^{Aa}	7,03 ^{Aa}	6,81
	s	± 0,33	± 0,32	± 1,00	± 0,31	± 0,33	± 0,28	± 0,29	± 0,38	
-Cu (n=10)	Média	6,70 ^{Aa}	6,84 ^{Aa}	6,92 ^{Aa}	7,19 ^{Aa}	6,80 ^{Aa}	6,92 ^{Aa}	6,67 ^{Aa}	7,04 ^{Aa}	6,89
	s	± 0,37	± 0,28	± 0,29	± 0,40	± 0,23	± 0,19	± 0,45	± 0,34	
Média momentos		6,63	6,85	6,71	6,14	6,76	6,92	6,70	7,04	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 22. Concentração plasmática de proteína total (g/dL) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 0,94; p > 0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F = 0,16; p > 0,50	Não houve interação, perfis iguais. Contr = -Zn = -Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F = 13,86; p > 0,10	Não houve efeito significativo M7=M8=M9=M10=M11=M12=M13=M14

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

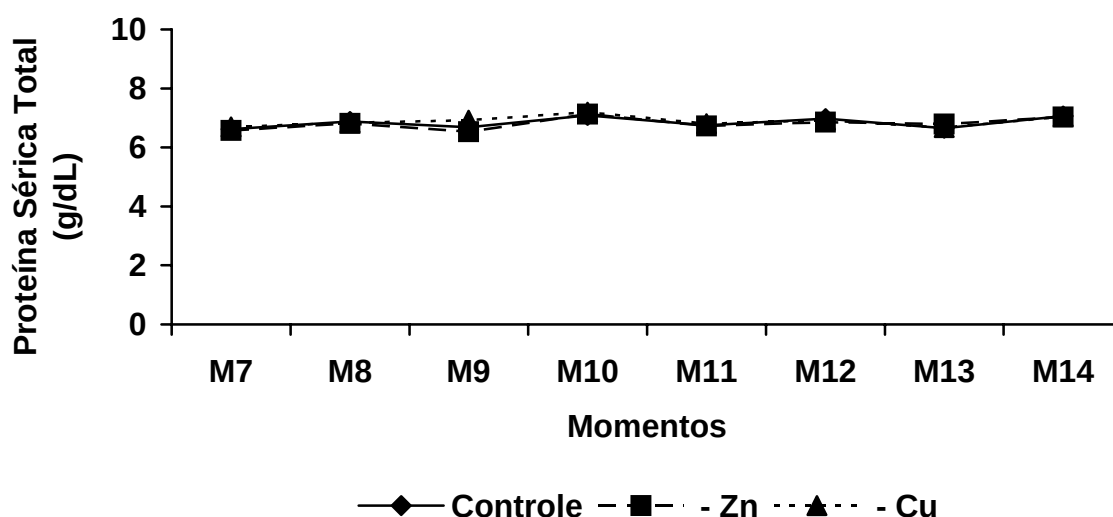


FIGURA 12. Representação gráfica das médias da concentração sérica de proteína total (g/dL) de bezerros Nelores sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.4. Proteína plasmática Total (reforço vacinal)

TABELA 23. Médias e desvios padrões da concentração plasmática de proteína total (g/dL) ao reforço vacinal, de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=11)	Médias	9,69 ^{Aa}	7,12 ^{Aa}	7,12 ^{Aa}	7,01 ^{Aa}	7,06 ^{Aa}	6,82 ^{Aa}	6,96 ^{Aa}	5,81
	s	± 0,51	± 0,29	± 0,36	± 0,38	± 0,44	± 0,42	± 0,34	
-Zn (n=11)	Médias	6,90 ^{Aa}	6,98 ^{Aa}	7,48 ^{Aa}	7,33 ^{Aa}	7,29 ^{Aa}	6,92 ^{Aa}	7,2 ^{Aa}	7,53
	s	± 0,41	± 0,24	± 0,32	± 0,27	± 0,37	± 0,38	± 0,33	
-Cu (n=11)	Médias	6,92 ^{Aa}	7,28 ^{Aa}	7,22 ^{Aa}	7,15 ^{Aa}	7,14 ^{Aa}	6,76 ^{Aa}	7,04 ^{Aa}	7,05
	s	± 0,38	± 0,33	± 0,33	± 0,40	± 0,42	± 0,31	± 0,40	
Média momentos		6,79	6,68	6,68	6,37	6,59	7,59	6,89	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 24. Concentração plasmática de proteína total (g/dL) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 0,79; p < 0,05	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F = 2,86; p > 0,10	Perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F = 1,13; p > 0,10	Não houve efeito dos momentos (M15=M16=M17=M18= M19=M20=M21)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais

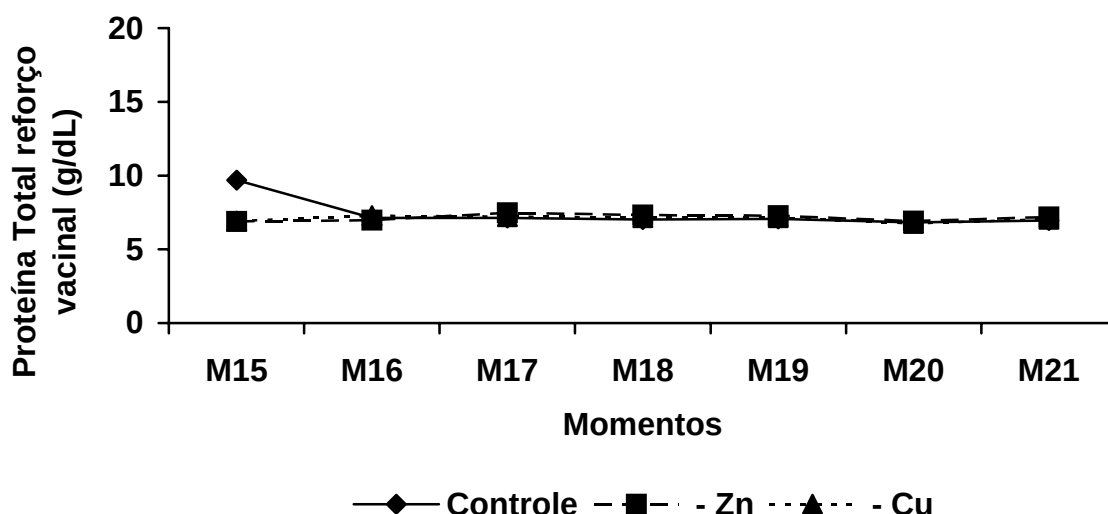


FIGURA 13. Representação gráfica das médias da concentração sérica de proteína plasmática total (g/dL) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.5. Fibrinogênio Sérico

TABELA 25. Médias e desvios padrões da concentração de fibrinogênio (mg/dL) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média S	290 ^{Bb} ±119,72	390 ^{Aa} ±119,72	190 ^{Ac} ±144,91	430 ^{Aa} ±188,86	360 ^{Aa} ±227,06	370 ^{Aa} ±216,28	250 ^{Ab} ±184,09	220 ^{Ab} ±139,84	312,5
-Zn (n=11)	Média S	230 ^{Bb} ±125,17	320 ^{ABab} ±103,28	250 ^{Ab} ±135,40	380 ^{Aa} ±193,22	200 ^{Aa} ±124,72	350 ^{Aa} ±135,40	290 ^{Ab} ±233,10	210 ^{Ab} ±137,03	278,75
-Cu (n=11)	Média S	420 ^{Aa} ±193,22	220 ^{Bb} ±131,66	210 ^{Ab} ±87,56	410 ^{Aa} ±213,18	240 ^{Ab} ±117,38	390 ^{Aa} ±196,92	320 ^{Ab} ±147,57	190 ^{Ab} ±128,67	300
Média momentos		313,33	310,00	216,67	406,67	266,67	370,00	286,67	206,67	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 26. Concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 3,33; p < 0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M7: F = 4,20; p < 0,05 M8: F = 5,17; p < 0,05 M9: F = 0,60; p < 0,50 M10: F = 0,16; p < 0,50 M11: F = 2,57; p > 0,10 M12: F = 0,12; p > 0,50 M13: F = 0,34; p > 0,50 M14: F = 0,13; p > 0,50	M0: (G1=G2)<G3 M1: G1>G3 (G2 intermediário) M2, M3, M4, M5, M6 e M7: G1=G2=G3
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F = 14,90; p < 0,05 -Zn: F = 5,62; p < 0,05 -Cu: F = 14,22; p < 0,05	Contr: M9<(M14=M13=M14)<(M8=M10=M11=M12) -Zn: (M14=M9=M11=M14)<(M10=M12) (M8=M13 intermediários) -Cu: (M8=M9=M11=M14)<(M14=M10=M12) (M13 intermediário)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

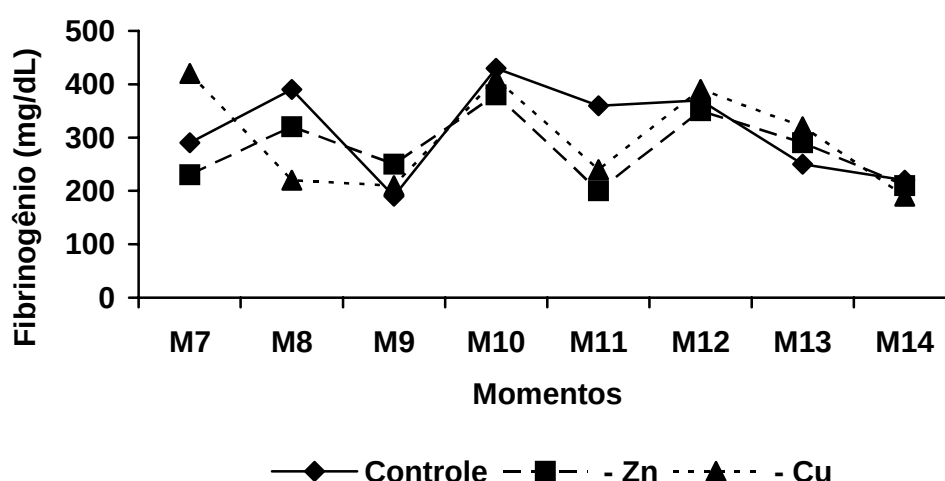


FIGURA 14. Representação gráfica das médias da concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.6. Fibrinogênio sérico (reforço vacinal)

TABELA 27. Médias e desvios padrões da concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média	300 ^{Ab}	330 ^{Ab}	340 ^{Ab}	370 ^{Ab}	420 ^{Aa}	510 ^{Aa}	380 ^{Ab}	378,57
	S	± 226,08	± 216,28	± 134,99	± 133,75	± 147,57	± 191,20	± 147,57	
-Zn (n=10)	Média	400 ^{Ab}	340 ^{Ab}	580 ^{Ab}	500 ^{Ab}	580 ^{Aa}	460 ^{Aa}	380 ^{Ab}	458,57
	S	± 223,61	± 134,99	± 198,89	± 176,38	± 348,97	± 189,74	± 113,52	
-Cu (n=10)	Média	370 ^{Ab}	420 ^{Ab}	400 ^{Ab}	380 ^{Ab}	420 ^{Aa}	440 ^{Aa}	400 ^{Ab}	404,29
	S	± 211,08	± 198,89	± 230,94	± 198,89	± 147,57	± 157,76	± 188,56	
Média momentos		346,67	363,33	440,00	416,67	473,33	470,00	386,66	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 28. Concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,16; p>0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F= 2,29; p>0,10	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F= 2,15; p=0,05	Houve efeito significativo dos momentos (M15=M16=M17=M18=M21)<(M19=M20)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

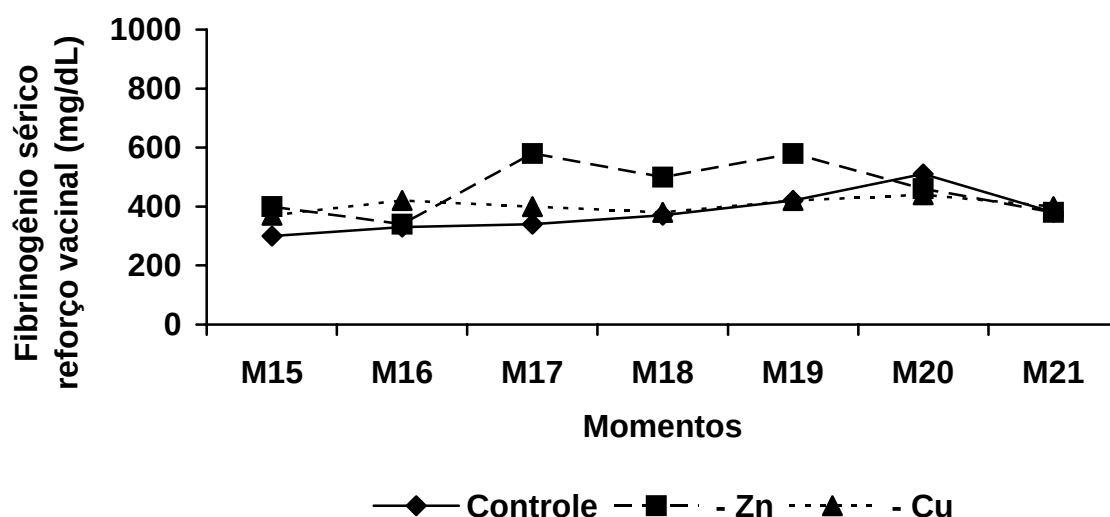


FIGURA 15. Representação gráfica das médias da concentração sérica de fibrinogênio (mg/dL) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.7 Leucócitos

TABELA 29. Médias e desvios padrões da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=11)	Média S	17,17 ^{Aa} ± 4,49	19,40 ^{Aa} ± 4,18	17,55 ^{Aa} ± 4,20	16,93 ^{Aa} ± 4,94	16,42 ^{Aa} ± 4,40	16,53 ^{Aa} ± 4,38	17,53 ^{Aa} ± 3,14	17,34 ^{Aa} ± 3,84	17,36
-Zn (n=11)	Média S	17,54 ^{Aa} ± 1,79	18,61 ^{Aa} ± 2,20	18,33 ^{Aa} ± 2,09	17,29 ^{Aa} ± 3,44	17,62 ^{Aa} ± 2,13	16,41 ^{Aa} ± 2,80	18,00 ^{Aa} ± 3,22	16,83 ^{Aa} ± 3,15	17,58
-Cu (n=11)	Média S	15,42 ^{Aa} ± 3,64	15,02 ^{Aa} ± 3,56	16,50 ^{Aa} ± 3,24	15,17 ^{Aa} ± 2,99	14,70 ^{Aa} ± 3,21	14,52 ^{Aa} ± 2,75	14,94 ^{Aa} ± 3,96	15,44 ^{Aa} ± 2,00	15,21
Média momentos		16,71	17,68	17,46	16,46	16,25	15,82	16,82	16,54	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 30. Concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 1,44; p > 0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F = 1,85; p > 0,10	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F = 0,87; p > 0,10	Não houve efeito significativo M7=M8=M9=M10=M11=M12=M13=M14

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

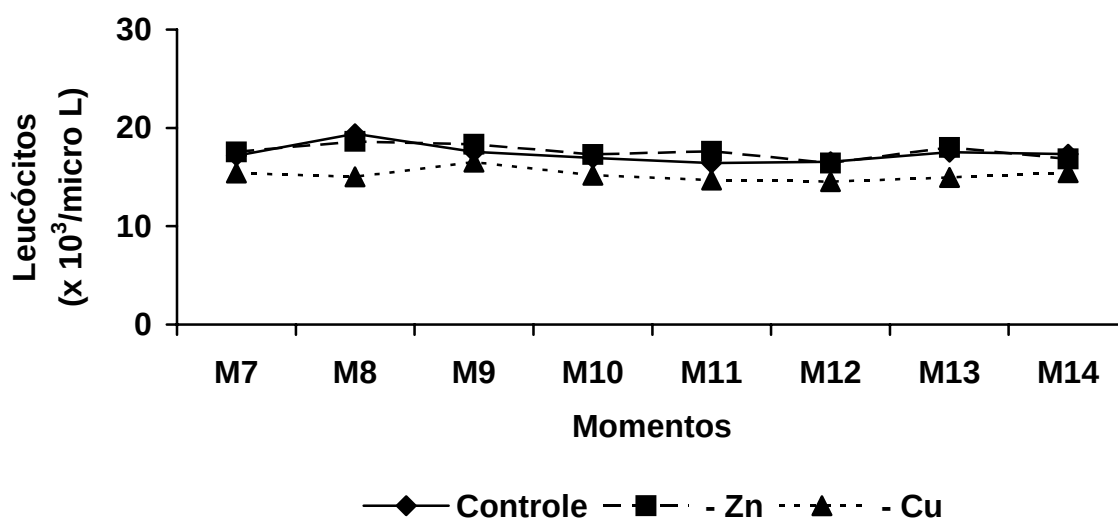


FIGURA 16. Representação gráfica das médias da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.8. Leucócitos (reforço vacinal)

TABELA 31. Médias e desvios padrões da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal, de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	17,45 ^{ABab} ± 3,38	17,57 ^{ABab} ± 3,23	18,51 ^{ABb} ± 4,00	17,61 ^{ABab} ± 3,17	16,66 ^{ABab} ± 2,39	16,07 ^{ABa} ± 2,45	16,12 ^{ABa} ± 2,06	17,14
-Zn (n=11)	Médias	17,64 ^{Aab} ± 3,44	19,13 ^{Aab} ± 4,63	19,60 ^{Ab} ± 6,05	18,43 ^{Aab} ± 3,99	17,09 ^{Aab} ± 3,35	16,34 ^{Aa} ± 3,32	17,42 ^{Aa} ± 4,08	17,95
-Cu (n=11)	Médias	14,83 ^{Bab} ± 2,24	14,62 ^{Bab} ± 2,05	14,52 ^{Bb} ± 1,72	14,85 ^{Bab} ± 2,15	14,37 ^{Bab} ± 1,64	14,94 ^{Ba} ± 1,48	13,56 ^{Ba} ± 2,41	14,52
Média momentos		16,64	17,11	17,54	16,96	16,04	15,78	15,70	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 32. Concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,38; p>0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F= 4,18; p<0,05	Perfis em níveis diferentes. -Zn>-Cu (Contr intermediário)
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F= 4,98; p<0,05	Houve efeito significativo dos momentos M17>(M20=M21) (M15=M16=M18= M19 intermediários)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

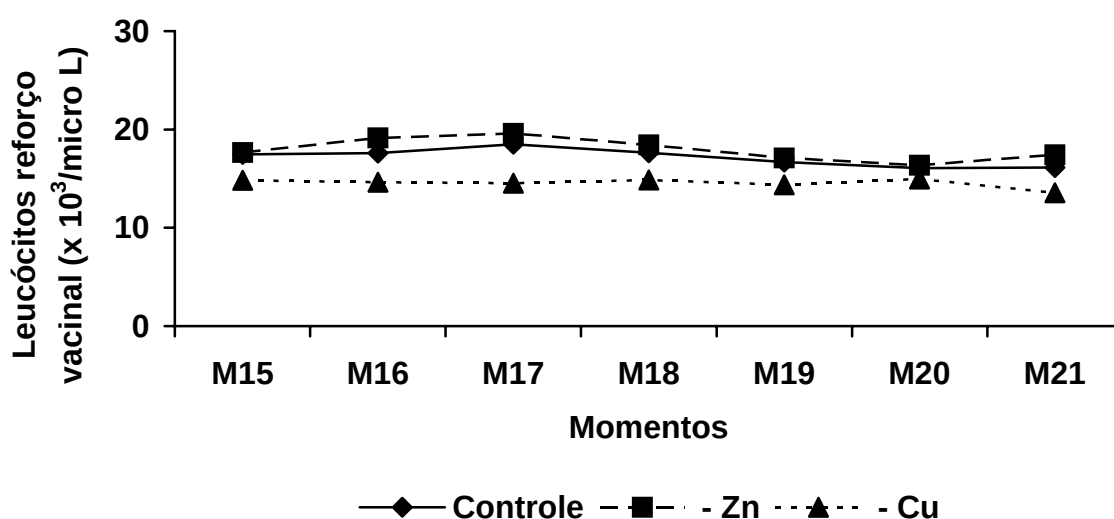


FIGURA 17. Representação gráfica das médias da concentração de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.10. Neutrófilos

TABELA 33. Médias e desvios padrões da concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média	3,62 ^{Aab}	4,25 ^{Aa}	4,44 ^{Aab}	4,12 ^{Aab}	3,94 ^{Aab}	3,72 ^{Ab}	3,46 ^{Ab}	3,43 ^{Ab}	3,87
	S	$\pm 0,83$	$\pm 0,53$	$\pm 1,21$	$\pm 1,22$	$\pm 1,99$	$\pm 0,93$	$\pm 0,72$	$\pm 0,83$	
-Zn (n=10)	Média	3,98 ^{Aab}	4,98 ^{Aa}	4,59 ^{Aab}	3,94 ^{Aab}	3,91 ^{Aab}	3,47 ^{Ab}	3,73 ^{Ab}	3,63 ^{Ab}	4,03
	S	$\pm 0,90$	$\pm 1,07$	$\pm 1,49$	$\pm 1,18$	$\pm 0,96$	$\pm 0,81$	$\pm 1,06$	$\pm 0,74$	
-Cu (n=10)	Média	4,95 ^{Aab}	4,67 ^{Aa}	4,12 ^{Aab}	3,59 ^{Aab}	3,16 ^{Aab}	3,05 ^{Ab}	3,29 ^{Ab}	3,17 ^{Ab}	3,75
	S	$\pm 4,63$	$\pm 0,93$	$\pm 1,06$	$\pm 1,24$	$\pm 1,05$	$\pm 0,84$	$\pm 0,89$	$\pm 0,63$	
Média momentos		4,18	4,63	4,38	3,88	3,67	3,41	3,49	3,41	-

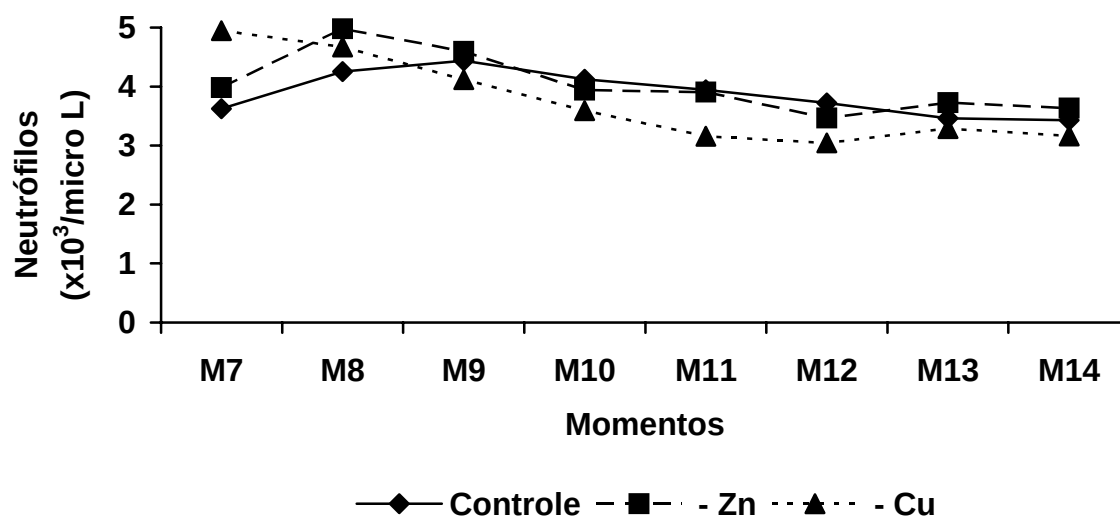
Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 34. Concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 0,97; p > 0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F = 0,30; p > 0,50	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F = 4,53; p < 0,05	Houve efeito significativo M8 > (M12=M13=M14) (M7=M9=M10=M11 intermediários)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

FIGURA 18. Representação gráfica das médias da concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.11. Neutrófilos (reforço vacinal)

TABELA 35. Médias e desvios padrões de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	3,66 ^{Ab} ± 0,93	4,21 ^{Bab} ± 0,88	5,40 ^{Aa} ± 1,29	4,13 ^{ABab} ± 0,98	4,00 ^{Aab} ± 1,23	3,43 ^{Ab} ± 1,47	3,86 ^{Ab} ± 1,27	4,10
-Zn (n=10)	Médias	4,55 ^{Ab} ± 1,87	6,69 ^{Aa} ± 3,72	7,07 ^{Aa} ± 4,26	5,11 ^{Aab} ± 2,56	4,56 ^{Ab} ± 1,99	5,17 ^{Aab} ± 4,03	4,14 ^{Ab} ± 1,64	5,33
-Cu (n=10)	Médias	3,33 ^{Aab} ± 0,48	3,76 ^{Bab} ± 0,60	4,58 ^{Aa} ± 0,57	3,21 ^{Bb} ± 0,51	3,11 ^{Ab} ± 0,61	3,26 ^{Aab} ± 0,86	3,25 ^{Aab} ± 0,70	3,50
Média Momentos		3,85	4,88	5,70	4,15	3,89	3,95	3,75	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 36. Concentração de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 2,80; p < 0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M15: F = 2,63; p > 0,10 M16: F = 5,00; p < 0,05 M17: F = 2,41; p > 0,10 M18: F = 3,50; p < 0,05 M19: F = 2,73; p > 0,10 M20: F = 1,75; p > 0,10 M21: F = 1,32; p > 0,10	M15: Contr = -Zn = -Cu M16: -Zn > (Contr = -Cu) M17: (-Zn > -Cu) (Contr intermediário) M18, M19, M20 e M21: Contr = -Zn = -Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F = 8,89; p < 0,05 -Zn: F = 21,37; p < 0,05 -Cu: F = 10,52; p < 0,05	Contr: M17 > (M15 = M20 = M21) (M16 = M18 = M19 intermediários) -Zn: (M16 = M17) > (M15 = M19 = M21) (M18 = M20 intermediários) -Cu: M17 > (M18 = M19) (demais intermed.)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

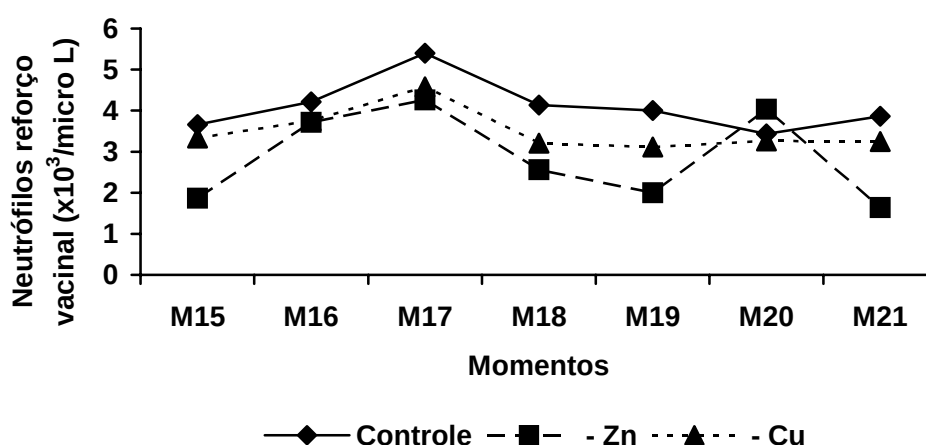


FIGURA 19. Representação gráfica das médias de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.10. Linfócitos

TABELA 37. Médias e desvios padrões da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	11,79 ^{Ab} ± 3,98	13,66 ^{Aa} ± 3,50	11,37 ^{Ab} ± 3,50	11,16 ^{Ab} ± 4,86	10,65 ^{Ac} ± 3,75	11,30 ^{Ab} ± 4,28	12,71 ^{Aab} ± 2,73	12,19 ^{Aab} ± 3,91	11,85
-Zn (n=10)	Médias	11,82 ^{Aa} ± 2,00	12,16 ^{Aa} ± 2,80	12,02 ^{Aa} ± 2,29	11,77 ^{Aa} ± 3,60	11,81 ^{Aa} ± 2,08	11,32 ^{Aa} ± 2,55	12,66 ^{Aa} ± 2,61	11,39 ^{Aa} ± 3,28	11,87
-Cu (n=10)	Médias	10,34 ^{Aa} ± 3,21	9,16 ^{Ba} ± 3,07	10,92 ^{Aa} ± 2,14	10,12 ^{Aa} ± 2,28	10,01 ^{Aa} ± 2,55	10,18 ^{Aa} ± 2,22	10,11 ^{Aa} ± 3,38	10,89 ^{Aa} ± 1,58	10,22
Média momentos		11,31	11,66	11,44	11,02	10,80	10,93	11,83	11,49	-

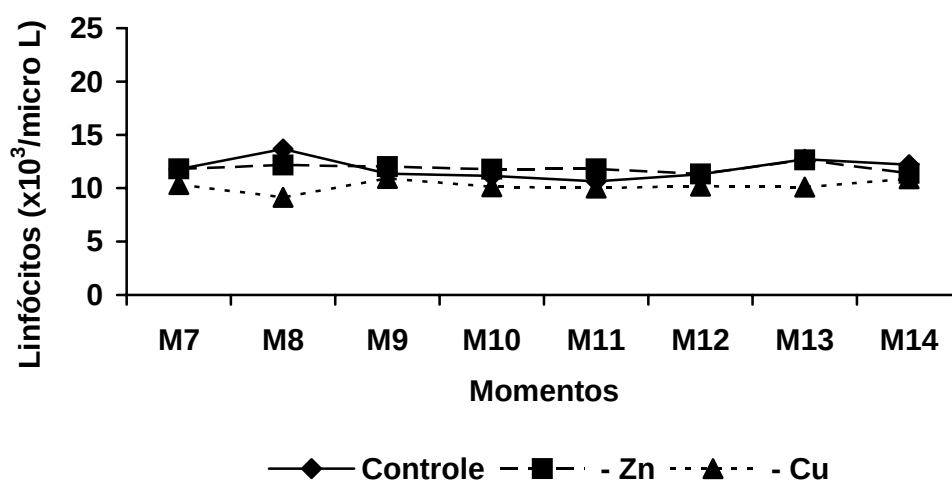
Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 38. Concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,84; p < 0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M7: F= 0,72; p>0,10 M8: F= 5,35; p<0,05 M9: F= 0,42; p>0,50 M10: F= 0,50; p>0,50 M11: F= 1,00; p>0,10 M12: F= 0,43; p>0,50 M13: F= 2,58; p>0,10 M14: F= 0,45; p>0,50	M7: Contr=-Zn=-Cu M8: (Contr=-Zn)>-Cu M9, M10, M11, M12, M13 e M14: Contr=-Zn=-Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F= 12,41; p<0,05 -Zn: F= 4,47; p>0,05 -Cu: F= 3,86; p>0,10	Contr: M8>(M14=M9=M10=M12)>M11 (M13 e M14 intermediários) -Zn: M7=M8=M9=M10=M11=M12=M13=M14 -Cu: M7=M8=M9=M10=M11=M12=M13=M14

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

FIGURA 20. Representação gráfica das médias da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

4.9.11. Linfócitos (reforço vacinal)

TABELA 39. Médias e desvios padrões da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal, de bezerros Nelores sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média S	12,25 ^{Aa} ± 2,70	11,92 ^{Aa} ± 2,40	11,46 ^{Aa} ± 3,33	11,93 ^{Aa} ± 2,47	10,98 ^{Aa} ± 1,48	11,19 ^{Aa} ± 1,51	10,65 ^{Aa} ± 1,06	11,48
-Zn (n=10)	Média S	11,55 ^{Aa} ± 2,79	11,06 ^{Aa} ± 2,85	10,89 ^{Aa} ± 2,47	11,41 ^{Aa} ± 2,47	10,77 ^{Aa} ± 2,517	11,11 ^{Aa} ± 3,03	11,41 ^{Aa} ± 2,59	11,17
-Cu (n=10)	Média S	10,05 ^{Aa} ± 2,19	9,25 ^{Aa} ± 2,31	8,36 ^{Aa} ± 1,81	9,96 ^{Aa} ± 2,39	9,63 ^{Aa} ± 2,22	10,37 ^{Aa} ± 1,77	8,99 ^{Aa} ± 2,22	9,52
Média momentos		11,28	10,74	10,24	11,10	10,46	10,89	10,35	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 40. Concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 0,94; p>0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F= 3,08; p>0,05	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F= 1,98; p>0,10	Não houve efeito significativo dos momentos M15=M16=M17=M18= M19=M20=M21

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

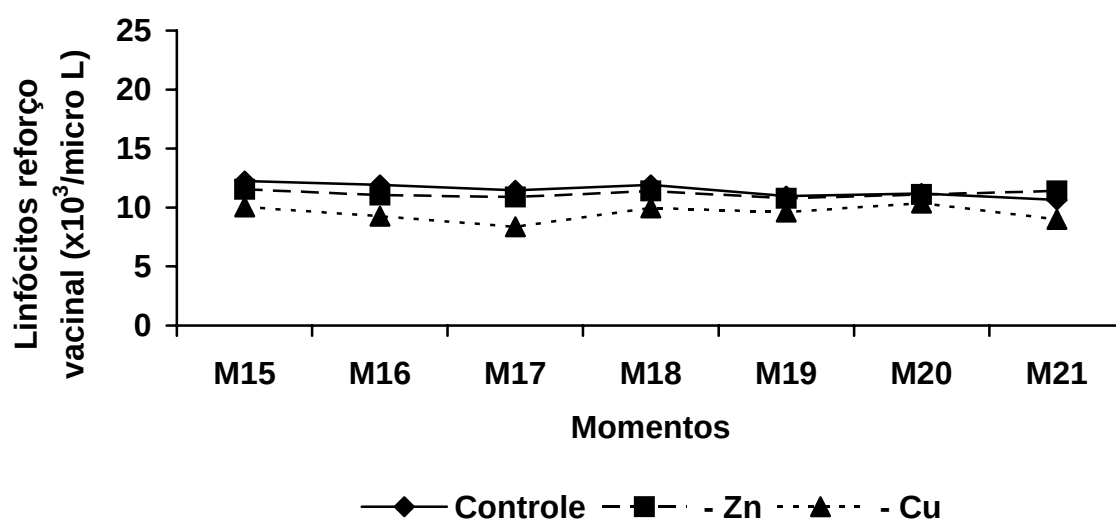


FIGURA 21. Representação gráfica das médias da concentração de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M8 a M14)

4.9.12. Monócitos

TABELA 41. Médias e desvios padrões da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média S	1,17 ^{Aa} ± 0,49	1,09 ^{Aa} ± 0,51	1,16 ^{Aa} ± 0,28	1,12 ^{Aa} ± 0,37	1,32 ^{Aa} ± 0,46	1,02 ^{Aa} ± 0,35	0,93 ^{Aa} ± 0,22	1,03 ^{Aa} ± 0,26	1,11
-Zn (n=10)	Média S	1,08 ^{Aa} ± 0,29	1,00 ^{Aa} ± 0,39	1,13 ^{Aa} ± 0,36	1,03 ^{Aa} ± 0,34	1,26 ^{Aa} ± 0,26	0,99 ^{Aa} ± 0,35	1,05 ^{Aa} ± 0,28	1,08 ^{Aa} ± 0,29	1,08
-Cu (n=10)	Média S	1,08 ^{Aa} ± 0,22	0,92 ^{Aa} ± 0,21	1,12 ^{Aa} ± 0,31	1,06 ^{Aa} ± 0,42	1,14 ^{Aa} ± 0,26	0,93 ^{Aa} ± 0,18	0,99 ^{Aa} ± 0,24	0,96 ^{Aa} ± 0,23	1,02
Média momentos		1,11	1,00	1,14	1,07	1,24	0,98	0,99	1,02	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 42. Concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 0,41; p > 0,50	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F = 0,29; p > 0,50	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F = 1,20; p > 0,10	Não houve efeito significativo M7=M8=M9=M10=M11=M12=M13=M14

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

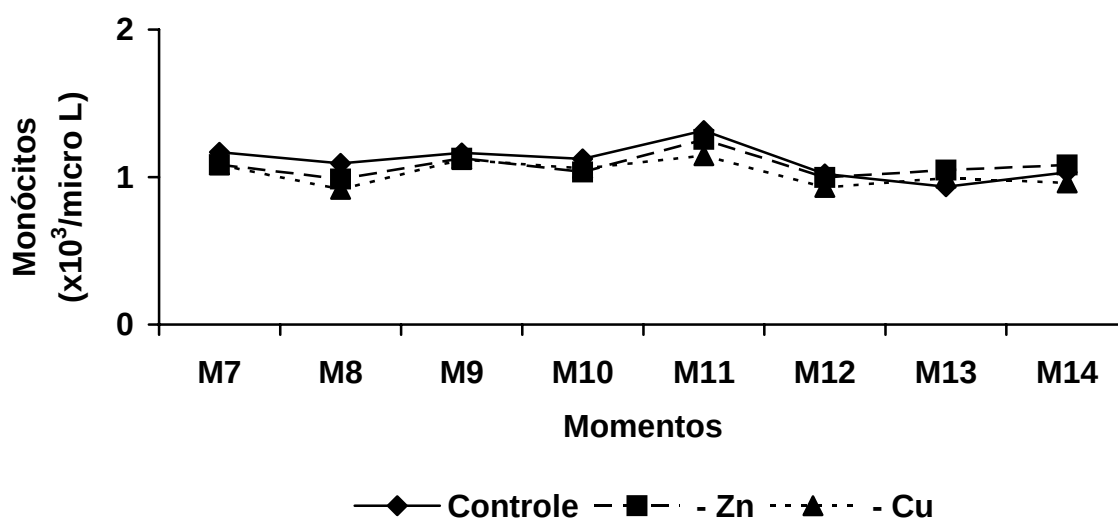


FIGURA 22. Representação gráfica das médias da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.13. Monócitos (reforço vacinal)

TABELA 43. Médias e desvios padrões da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M8 a M14)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média S	1,05 ^{Aab} ± 0,39	0,96 ^{Ab} ± 0,38	1,24 ^{Aab} ± 0,34	1,31 ^{ABa} ± 0,32	1,09 ^{Aab} ± 0,33	0,91 ^{Ab} ± 0,31	1,01 ^{ABab} ± 0,25	1,08
-Zn (n=10)	Média S	1,04 ^{Ab} ± 0,24	1,10 ^{Ab} ± 0,29	1,29 ^{Aab} ± 0,64	1,52 ^{Aa} ± 0,39	1,24 ^{Aab} ± 0,46	1,07 ^{Ab} ± 0,24	1,30 ^{Aab} ± 0,59	1,22
-Cu (n=10)	Média S	0,79 ^{Aa} ± 0,20	0,91 ^{Aab} ± 0,19	1,00 ^{Ab} ± 0,23	1,00 ^{Bb} ± 0,19	0,95 ^{Aab} ± 0,20	0,90 ^{Aab} ± 0,14	0,86 ^{Bab} ± 0,18	0,91
Média momentos		0,96	0,99	1,18	1,27	1,09	0,96	1,06	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 44. Concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 3,07; p <0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M15: F= 2,67; p>0,10 M17: F= 1,28; p>0,10 M19: F= 1,72; p>0,10 M21: F= 3,34; p=0,05 M16: F= 1,08; p>0,10 M18: F= 7,03; p<0,05 M20: F= 1,56; p>0,10	M15. M16, M17: Contr=-Zn=-Cu M18: (-Zn>-Cu) (Contr intermediário) M19 e M20: Contr=-Zn=-Cu M21: (-Zn>-Cu) (Contr intermediário)
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F= 14,92; p<0,05 -Zn: F= 34,74; p<0,05 -Cu: F= 6,81; p<0,05	Contr: (M16=M20)<M18 (demais intermed.) -Zn: M18>(M15=M16=M20) (M17=M19=M21 intermediários) -Cu: M15>(M17=M18) (M16=M19=M20=M21 intermediários)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

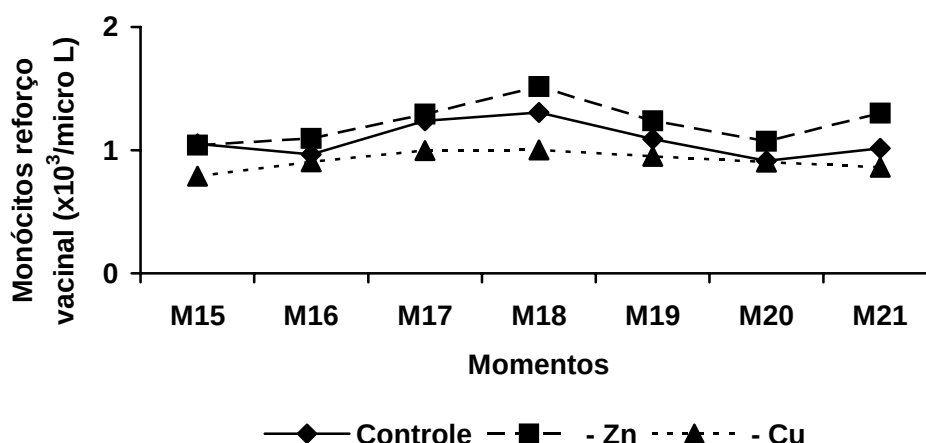


FIGURA 23. Representação gráfica das médias da concentração de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.14. Eosinófilos

TABELA 45. Médias e desvios padrões da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

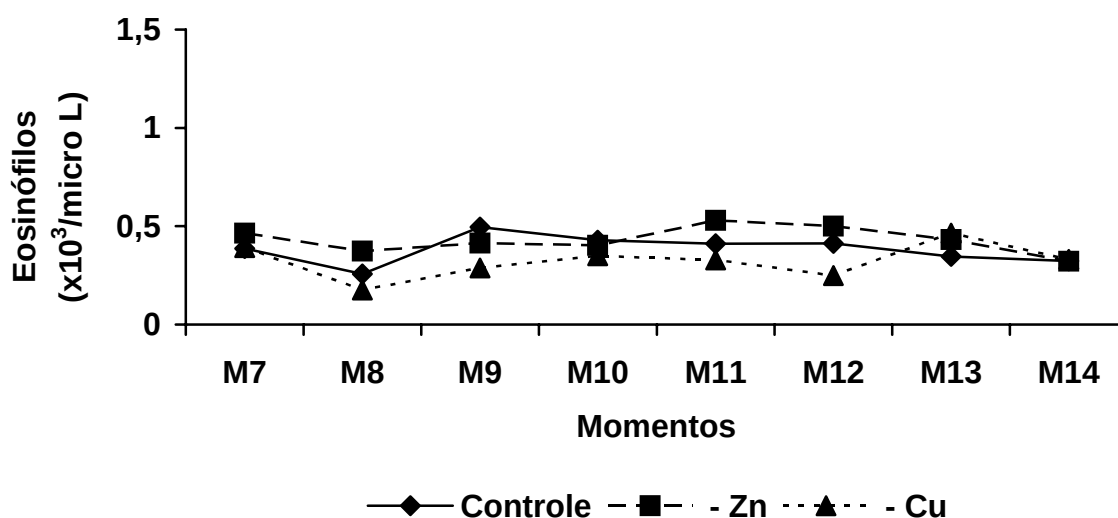
Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média S	0,39 ^{Aa} ± 0,21	0,26 ^{Aa} ± 0,28	0,50 ^{Aa} ± 0,29	0,43 ^{Aa} ± 0,35	0,41 ^{Aa} ± 0,25	0,41 ^{Aa} ± 0,55	0,35 ^{Aa} ± 0,27	0,32 ^{Aa} ± 0,21	0,38
-Zn (n=10)	Média S	0,47 ^{Aa} ± 0,35	0,37 ^{Aa} ± 0,45	0,41 ^{Aa} ± 0,29	0,40 ^{Aa} ± 0,39	0,53 ^{Aa} ± 0,49	0,5 ^{Aa} ± 0,62	0,43 ^{Aa} ± 0,54	0,32 ^{Aa} ± 0,34	0,43
-Cu (n=10)	Média S	0,39 ^{Aa} ± 0,27	0,18 ^{Aa} ± 0,23	0,29 ^{Aa} ± 0,21	0,35 ^{Aa} ± 0,40	0,33 ^{Aa} ± 0,32	0,25 ^{Aa} ± 0,21	0,46 ^{Aa} ± 0,39	0,33 ^{Aa} ± 0,38	0,32
Média momentos		0,41	0,27	0,40	0,39	0,42	0,39	0,41	0,33	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.
Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 46. Concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 0,79; p > 0,10	Não houve interação significativa. Perfis similares.
2- Efeito dos grupos para o conjunto dos momentos	F = 0,35; p > 0,50	Não houve interação, perfis iguais. Contr=-Zn=-Cu
3- Efeito dos momentos para o conjunto dos grupos	F = 1,52; p > 0,10	Não houve efeito significativo M7=M8=M9=M10=M11=M12=M13=M14

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

FIGURA 24. Representação gráfica das médias da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.15. Eosinófilos (reforço vacinal)

TABELA 47. Médias e desvios padrões da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	0,33 ^{Aab} ± 0,17	0,34 ^{ABab} ± 0,44	0,33 ^{Aab} ± 0,36	0,17 ^{Bb} ± 0,07	0,43 ^{Aa} ± 0,43	0,43 ^{Aa} ± 0,41	0,49 ^{Aab} ± 0,49	0,36
-Zn (n=10)	Médias	0,28 ^{Aab} ± 0,33	0,12 ^{Bb} ± 0,12	0,23 ^{Aab} ± 0,17	0,28 ^{Bab} ± 0,23	0,32 ^{Aab} ± 0,23	0,32 ^{Aab} ± 0,25	0,41 ^{Aa} ± 0,40	0,28
-Cu (n=10)	Médias	0,56 ^{Aab} ± 0,46	0,57 ^{Aab} ± 0,48	0,49 ^{Aab} ± 0,39	0,60 ^{Aab} ± 0,56	0,64 ^{Aa} ± 0,62	0,34 ^{Ab} ± 0,18	0,34 ^{Ab} ± 0,30	0,51
Média momentos		0,39	0,34	0,35	0,35	0,46	0,36	0,41	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 48. Concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F = 2,47; p < 0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M15: F = 1,98; p > 0,10 M17: F = 1,61; p > 0,10 M19: F = 1,29; p > 0,10 M21: F = 0,35; p > 0,50 M16: F = 3,52; p < 0,05 M18: F = 4,10; p < 0,05 M20: F = 0,45; p > 0,50	M15 e M17: Contr=-Zn=-Cu M16: (-Zn<-Cu) (Contr intermediário) M18: (Contr=-Zn)<-Cu M19, M20 e M21: Contr=-Zn=-Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F = 8,85; p < 0,05 -Zn: F = 6,37; p < 0,05 -Cu: F = 6,10; p < 0,05	Contr: (M19=M20)>M18 (M15=M16=M17=M21 intermediários) -Zn: M16<M21 (M15=M17=M18=M19=M20 intermed.) -Cu: M19>(M20=M21) (demais intermed.)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

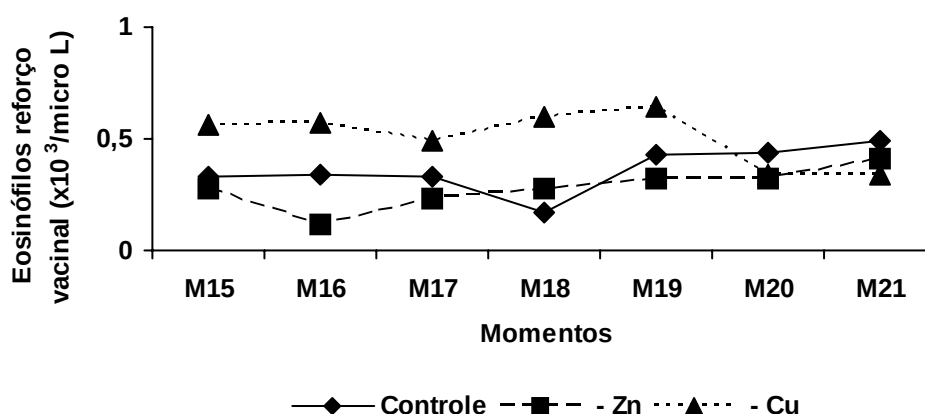


FIGURA 25. Representação gráfica das médias da concentração de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

4.9.16. Basófilos

TABELA 49. Médias e desvios padrões da concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação

Grupos		M7 antes	M8 8 h.	M9 24 h.	M10 48 h.	M11 72 h.	M12 7 dias	M13 15 dias	M14 21 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Médias	0,12 ^{Aa} ± 0,06	0,12 ^{Aa} ± 0,05	0,08 ^{Ab} ± 0,04	0,08 ^{Ab} ± 0,03	0,08 ^{Aab} ± 0,02	0,10 ^{Aab} ± 0,03	0,10 ^{ABb} ± 0,02	0,09 ^{Aab} ± 0,03	0,096
-Zn (n=10)	Médias	0,17 ^{Aa} ± 0,07	0,11 ^{Ab} ± 0,05	0,08 ^{Ab} ± 0,03	0,11 ^{Ab} ± 0,07	0,09 ^{Ab} ± 0,05	0,13 ^{Aab} ± 0,06	0,21 ^{Aa} ± 0,28	0,12 ^{Aab} ± 0,06	0,126
-Cu (n=10)	Médias	0,14 ^{Aa} ± 0,07	0,09 ^{Aab} ± 0,05	0,06 ^{Ab} ± 0,03	0,08 ^{Aab} ± 0,04	0,07 ^{Ab} ± 0,03	0,07 ^{Aab} ± 0,03	0,09 ^{Bab} ± 0,03	0,09 ^{Aab} ± 0,04	0,09
Média momentos		0,14	0,11	0,074	0,089	0,080	0,10	0,13	0,10	-

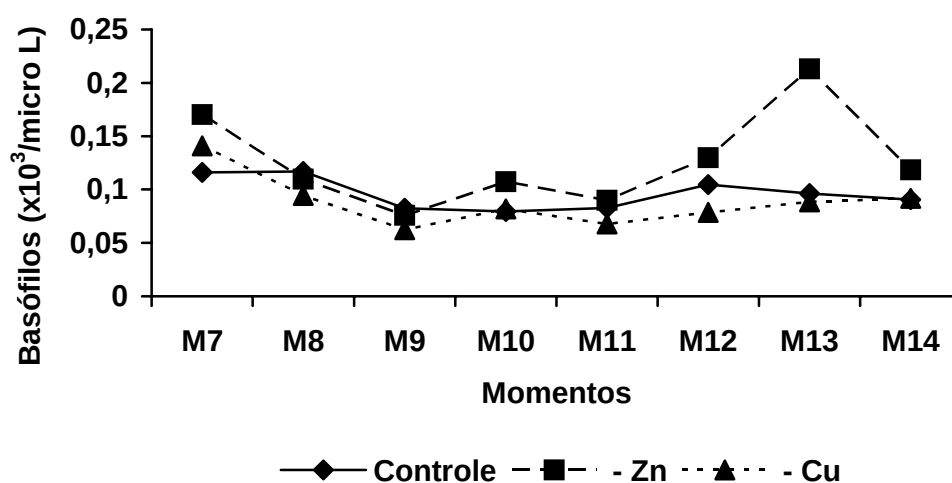
Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 50. Concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos bezerros, hipóteses testadas, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 1,96; p <0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M7: F= 1,72; p>0,10 M8: F= 0,56; p>0,50 M9: F= 0,90; p>0,10 M10: F= 1,00; p>0,10 M11: F= 1,08; p>0,10 M12: F= 3,51; p<0,05 M13: F= 1,82; p>0,10 M14: F= 1,32; p>0,10	M7, M8, M9, M10, M11, M12: Contr=-Zn=-Cu M13: -Zn>-Cu (Contr intermediário) M14: Contr=-Zn=-Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F= 7,28; p<0,05 -Zn: F= 19,92; p<0,05 -Cu: F= 14,07; p<0,05	Contr: (M7=M8)>(M9=M10) (M11=M12=M13=M14 intermediários) -Zn: (M7=M13)>(M8=M9=M10=M11) (M12=M14 intermediários) -Cu: M7>(M9=M11) (M8=M10=M12=M13=M14 intermed.)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

FIGURA 26. Representação gráfica das médias de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M7 a M14)

4.9.17. Basófilos (reforço vacinal)

TABELA 51. Médias e desvios padrões de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros em diferentes tratamentos e momentos de avaliação

Grupos		M15 antes	M16 8 h.	M17 24 h.	M18 48 h.	M19 72 h.	M20 7 dias	M21 15 dias	Média grupos
Controle (n=10)	Média	0,18 ^{Aa}	0,14 ^{Aab}	0,15 ^{Aab}	0,09 ^{Ab}	0,13 ^{ABb}	0,10 ^{Ab}	0,10 ^{Ab}	0,12
	S	0,08	0,04	0,08	0,02	0,06	0,02	0,03	
-Zn (n=10)	Média	0,21 ^{Aa}	0,18 ^{Aab}	0,13 ^{Ab}	0,12 ^{Ab}	0,21 ^{Aa}	0,11 ^{Ab}	0,15 ^{Aab}	0,16
	S	0,14	0,08	0,07	0,06	0,12	0,08	0,06	
-Cu (n=10)	Média	0,18 ^{Aa}	0,14 ^{Aab}	0,10 ^{Ab}	0,08 ^{Ab}	0,11 ^{Bb}	0,07 ^{Ab}	0,12 ^{Aab}	0,11
	S	0,04	0,05	0,04	0,02	0,04	0,03	0,04	
Média momentos		0,19	0,15	0,12	0,10	0,14	0,09	0,12	-

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre grupos.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre momentos.

TABELA 52. Concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal dos bezerros, hipóteses, estatística calculada e comentários (análise de perfil)

Hipótese	Estatística	Comentário
1- Interação entre grupos e momentos	F= 2,09; p <0,05	Houve interação significativa. Perfis não similares.
4- Diferenças entre grupos em cada momento	M15: F= 0,39; p>0,50 M17: F= 1,27; p>0,10 M19: F= 4,11; p<0,05 M21: F= 3,05; p>0,50	M16: F= 2,04; p>0,10 M18: F= 2,42; p>0,10 M20: F= 1,44; p>0,10 M15, M16, M17, M18: Contr=-Zn=-Cu M19: -Zn>-Cu (Contr intermediário) M20 e M21: Contr=-Zn=-Cu
5- Diferenças entre momentos dentro de cada grupo	Contr: F= 18,22; p<0,05 -Zn: F= 27,38; p<0,05 -Cu: F= 29,24; p<0,05	Contr: M15>(M18=M19=M20=M21) (M16=M17 intermediários) -Zn: (M15=M19)>(M17=M18=M20) (M16=M21 intermediários) -Cu: M15>(M17=M18=M19=M20) (M16=M21 intermediários)

Obs: hipóteses 4 e 5 perderam o efeito diante do resultado das demais.

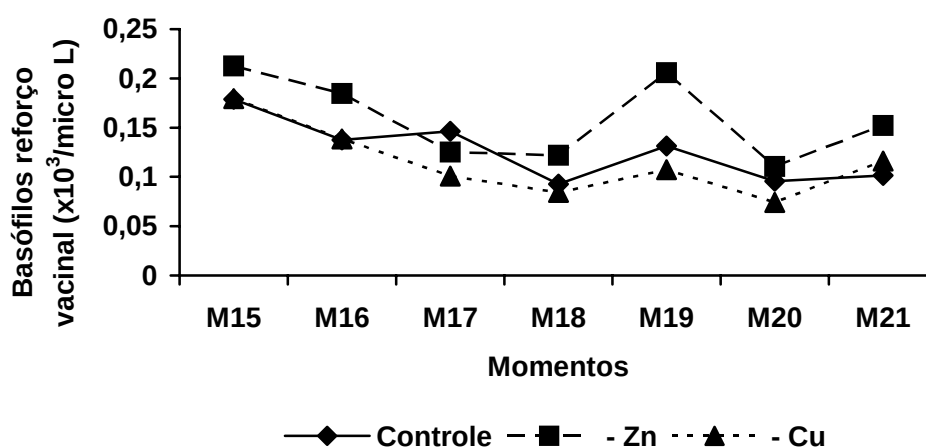


FIGURA 27. Representação gráfica das médias da concentração de basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ao reforço vacinal de bezerros Nelore sob diferentes tratamentos e momentos de avaliação (M15 a M21)

5) Conclusões:

- As dietas utilizadas no experimento não provocaram níveis hepáticos de Cu indicativos de deficiência. Apesar disto, os níveis séricos de Cu estiveram abaixo dos considerados adequados pela literatura consultada;
- As dietas utilizadas no experimento provocaram níveis hepáticos de Zn indicativos de deficiência. Apesar disto, os níveis séricos deste elemento nos bezerros mantiveram-se dentro dos parâmetros considerados adequados, exceto durante o último momento;
- Apesar de não terem sido observados níveis de Cu compatíveis com deficiência, foi observado o efeito dos diferentes teores deste mineral sobre a produção de anticorpos em resposta à vacina anti-C. chauvoei.
- Houve diferenças significativas na contagem das variáveis do hemograma, volume globular, leucócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, em momentos relacionados ao reforço vacinal, entre os grupos com distintos teores de Cu hepático.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ARTHUR, J.R.; BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. **Life Sci.**, Elmsford, v.36, p.1569-1575, 1985.

ASP, T.N.; LUND, W. Elemental analysis of bovine liver by inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry by using a simple dissolution procedure, **Talanta**, London, v.39, n.5, p.563-566, 1992.

BOYNE, R.; ARTHUR, J.R. Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v.91, p.271-276, 1981.

BORGES, A.S. **Valores séricos e hepáticos de elementos minerais, determinação da ceruloplasmina sérica, hemograma e metabolismo oxidativo de neutrófilos em novilhas nelore suplementadas com diferentes níveis nutricionais de cobre e zinco.** 2001. 141f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BRUM, P.A.R.; SOUZA, J.C.; FILHO, J.A.; ALMEIDA, I.L. Deficiências minerais de bovinos na sub-região dos Paiaguas, no Pantanal Mato-Grossense. II. Cobre, zinco, manganês e ferro. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, v.22, n.9/10, p.1049-1060, 1987.

CERONE, S.I.; SANSINANE, A.S.; AUZA, N.J. Copper deficiency alters the immune response of bovine. **Nutr. Res.**, Elmsford, v.15, p.1333-1341, 1995.

CERONE, S.I.; SANSINANE, A.S.; STREITENBERGER, S.A.; GARCIA, M.C.; AUZA, N.J. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v.22, p.47-57, 1998.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

COLES, E.H. **Veterinary clinical pathology**. Philadelphia: Saunders, 1986. p.139.

COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C. BARROS FILHO, I. R. Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural**, v. 30, p. 399-403, 2000.

COUSINS, R.J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiol. Rev.**, Baltimore, v.65, p.238-309, 1985.

CRICHTON, R.; SOLOMON, J.; BARTON, A.M. The development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Measuring the Potency of Vaccines Containing *Clostridium chauvoei* antigens. **Biologicals**, London, v.18, p.49-54, 1990.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Analytical methods for evaluation of immune response in nutrient intervention. **Nutr. Rev.**, Washington, v.56, n.1, p.27-37, 1998.

Di GENARO, M.S.; MICALIZZI, B.; GUZMAN, A.M.S. *Clostridium chauvoei*: immunological characterization of antigenic preparations. **Anaerobe**, England, v.5, p.301-303, 1999.

DORTON, K.L., ENGLE, T.; HAMAR, D.; SICILIANO, P.; YEMM, R. Effects of copper source and concentration on copper status and immune function in growing and finishing steer. **Anim. Feed Sci. Tech.**, Amsterdam, v.110, p.31-44, 2003.

ENGLE, T.E.; NOCKELS, C.F.; KIMBERLING, W.; WEABER, D.L.; JOHNSON, A.B. Zinc repletion with organic or inorganic forms of zinc and protein turnover in marginally zinc-deficient calves. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.75, p.3074-3081, 1997.

FAILLA, M.L.; HOPKINS, R.G. Is low copper status immunosuppressive? **Nutr. Rev.**, Washington, v.56, p.S59-64, 1998.

FICK, K.R.; McDOWELL, L.R.; MILES, P.H.; WILKINSON, N.S.; FUNK, J.D.; CONRAD, J.H. **Methods of mineral analysis for plant and animal tissues**. 2.ed. Gainesville: Animal Science Department, University of Florida, 1979. 90p.

GENGELBACH, G.P.; WARD, J.D.; SPEARS, J.W.; BROWN, T.T. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.75, p.1112-1118, 1997.

GRAHAM, T.H. Trace element deficiencies in cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v.7, p.153-215, 1991.

HANSARD, S.L.; MOHAMMED, A.S.; TURNER, J.W. Gestation age effects upon maternal-fetal zinc utilization in the bovine. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.27, p.1097-1102, 1968.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.

JONES, D.G.; SUTTLE, N.F. Some effects of copper deficiency on leucocyte function in sheep and cattle. **Res. Vet. Sci.**, London, v.31, p.151-156, 1981.

KEUSCH, G.T. Nutrition and infection. In: _____. **Modern nutrition in health and disease**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. v.1, p.1241-1258.

KUME, S.; TANABE, S. Effect of parity on colostrum mineral concentrations of holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.76, p.1654-1660, 1993.

LAI, C.C.; HUANG, W.H.; ASKARI, A.; WANG, Y.; SARWAZYAN, N.; KLEVAY, L.M.; CHIU, T.H. Differential regulation of superoxide dismutase in copper-deficient rat organs. **Free Radic. Biol. Med.**, Elmsford, v.16, p.613-620, 1994.

LAI, C.C.; HUANG, W.H.; KLEAVY, L.M.; CUNNING, W.T.; CHIU, T.H. Antioxidant enzyme gene transcription in copper-deficient rat liver. **Free Radic. Biol. Med.**, Elmsford, v.21, p.233-240, 1996.

LEI, K.Y.; WU, J.Y.J.; ZHANG, J.J. Regulation of apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells depleted of copper by cupruritic tetramine. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.**, Bethesda, v.11, p.A362, 1997.

MARSTON, T. Trace mineral supplementation in beef cattle. Part I. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, Princeton Junction, v.21, p.21-27, 1999

MATTAR, M.A.; CORTIÑAS, T.; DI GENARO, M. Immunogenic power of cellular and extracellular antigens of *Clostridium chauvoei* strain isolated in San Luis, Argentina. **Anaerobe**, England, v.5, p.295-296, 1999.

McDOWELL, L.R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3.ed. Florida: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, 1999. 92p.

MENARD, M.P.; COUSINS, R.J. Zinc transport by brush border membrane vesicles from rat intestine. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.113, p.1434-1442, 1983.

MINATEL, L.; CARFAGNINI, J.C. Copper deficiency and immune response in ruminants. **Nutr. Res.**, Elmsford, v.20, p.1519-1529, 2000.

MORAES, S.S.; SILVA, G.N.; DÖBEREINER, J. Microelementos minerais e a "Cara Inchada" dos bovinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.14, p.25-33, 1994.

MORAIS, M.G.; RANGEL, J.M.; MADUREIRA, J.S.; SILVEIRA, A.C. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneloradas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.52, p.98-104, 2000.

MORRISON, D.F. **Multivariate statistical methods**. 2.ed. New York: Mc Graw Hill, 1967. 325p.

MYRVIK, Q.N. Immunology and nutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A. **Modern nutrition in health and disease**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. v.1, p.623-662.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriment of beef cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press, 1996. 242p.

PERCIVAL, S.S. Neutropenia caused by copper deficiency: possible mechanism of action. **Nutr. Rev.**, Washington, v.53, p.59-66, 1995.

POTT, E.B.; ALMEIDA, I.L.; BRUM, P.A.R.; FILHO, J.A.C.; POTT, A.; DYNIA, J.F. Nutrição mineral de bovinos de corte no pantanal Mato-Grossense: 2. Micronutrientes na Nhecolândia (Parte Central). **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, v.24, p.109-126, 1989a.

POTT, E.B.; BRUM, P.A.R.; POTT, A.; ALMEIDA, I.L.; FILHO, J.A.C.; TULLIO, R.R. Nutrição mineral de bovinos de corte no Pantanal Mato-Grossense. IV. Levantamento de micronutrientes no Baixo Piquiri. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, v.24, p.1369-1380, 1989b.

PROHASKA, J.R.; SUNDE, R.A.; ZINN, K.R. Livers from copper-deficient rats have lower glutathione peroxidase activity and m RNA levels but normal liver selenium levels. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v.3, p.429-436, 1992.

RANDHAWA, C.S.; RANDHAWA, S.S.; SOOD, N.K. Effect of molybdenum induced copper deficiency on peripheral blood cells and bone marrow in buffalo calves. **Asian-Australas. J. Anim. Sci.**, Suwon, v.15, n.4, p.509-515, 2002.

SAKER, K.E.; ALLEN, V.G.; KALNITSKY, J.; THATCHER, C.D.; SWECKER JR., W.S.; FONTENOT, J.P. Monocyte immune cell response and copper status in beef steers that grazed endophyte-infected tall fescue. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.76, p.2694-700, 1998.

SCHIPPER, I.A.; KELLING, C.L.; MAYER, J.; PFEIFFER, N.W. Effects of passive immunity on immune response in calves vaccinated against *Clostridium chauvoei* infection. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, Bonner Springs, v.78, p.1564-1566, 1978.

SMART, M.E.; NORTHCOLE, M.J. Liver biopses in cattle. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, Princeton, v.7, p.327-332, 1985.

SMART, M.E.; CHRISTENSEN, D.A.; SHORGOOL, M. The liver copper (Cu) and Zinc (Zn) concentrations of the bovine fetus and its dam during pregnancy. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.63, p.1021-1028, 1983.

SILVA, H.F. **Avaliação da bioquímica clínica de bezerros Nelore, nascidos de vacas em dieta adequada ou insuficiente em cobre ou zinco e mantidos sob a mesma nutrição mineral de suas mães até os seis meses de idade.** 2003. 149f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SOUZA, J.C.; DARSIE, G. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. I. Zinco e cobalto. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v.20, p.1309-1316, 1985.

SOUZA, J.C.; GOMES, R.F.C.; REZENDE, A.M.; ROSA, I.V.; CARDOSO, E.G.; GOMES, A.; COSTA, F.P.; OLIVEIRA, A.R.; COELHO NETO, L.; CURVO, J.B.E. Resposta de novilhos nelorados à suplementação mineral em pastagens de capim colômbio. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v.18, p.311-318, 1983.

SOUZA, J.C.; NICODEMO, M.L.F.; DARSIE, G. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. V. Cobre e Molibdenio. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v.24, p.1547-1554, 1989.

SPEARS, J.W.; HARVEY, R.W.; BROWN, T.T. Effects of zinc methionine and zinc oxide on performance, blood characteristics, and antibody titers response to viral vaccination in stressed feeder calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.199, p.1731-1733, 1991.

STABEL, J.R.; SPEARS, J.; BROWN, T. Effect of copper deficiency on tissue blood characteristics, and immune function calves challenged with infectious bovine rhinoracheitis virus *Pasteurella haemolytica*. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.71, p.1247-1255, 1993.

SUTTLE, N.F. Copper deficiency in ruminants; recent developments. **Vet. Rec.**, London, v.119, p.519-522, 1986.

TAMURA, Y.; MAKIE, H.; TANAKA, M. An indirect hemagglutination test for the detection of antibodies to *Clostridium chauvoei*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.10, p.315-324, 1985.

TAMURA, Y.; MAKIE, H.; TANAKA, M. Correlation between the indirect hemagglutination antibody and protection of mice against *Clostridium chauvoei*. **Jpn. J. Vet. Sci.**, Tokyo, v.48, p.1249-1251, 1986.

TIZARD, I. **Veterinary immunology**: an introduction. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. 482p.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; MORAES, S.S.; PEIXOTO, P. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos - revisão de estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.19, p.47-62, 1999.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasília, v.20, p.127-138, 2000.

TORRE, P.M.; HARMON, R.L.; SORDILLO, L.M.; BOISSONNEAULT, G.A.; HEMKEN, R.W.; TRAMMELL, D.S.; CLARK, T.W. Modulation of bovine mononuclear cell proliferation and cytokine production by dietary copper insufficiency. **J. Nutr. Immunol.**, Haworth, v.3, p.3-20, 1995.

UNDERWOOD, E.J. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4.ed. New York: Academic Press, 1977.

WARD, J.D.; GENGBACH, G.; SPEARS, J. The effects copper deficiency with or without high dietary iron or molybdenum on immune function of cattle. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.1400-1408, 1997.

WIKSE, S.E. The relationship of trace minerals deficiencies and infectious diseases of beef cattle. In: TEXAS BEEF CATTLE SHORT COURSE, 1992, Texas. **Proceedings...** Texas, 1992.

WIKSE, S.E.; HERD, D.; FIELD, R.; HOLLAND, P. Diagnosis of copper deficiency in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.200, p.1625-1629, 1992.

WILLIAMS, D. Copper deficiency in humans. **Semin. Hematol.**, Duluth, v.20, p.118-128, 1983.

WILSON, J.J.; IWAKIRI, Y.; CLARKE, S.D. Hepatic glutathione redox influences 3-hydroxy-3-methyl glutaryl Co-A reductase (HMG-CoAR) activity and message abundance. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.**, Bethesda, v.11, p.A361, 1997.

XIN, Z.; WATERMAN, D.F.; HEMKEN, R.W.; HARMON, R.J. Effects of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase and copper distribution in steers. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.74, p.3078- 3085, 1991.

Tabalho enviado para publicação na revista Journal of Veterinary Medicine A”

Response to *Clostridium chauvoei* vaccination in Nelore calves under copper or zinc insufficient nutrition.^A

Authors: Horrys Friaça Silva¹; João Pessoa Araújo Júnior²; Alexandre Secorun Borges¹; Rogério Martins AmoriST1; Márcio Rubens Graf Kuchembuck¹.

Corresponding author's e-mail adress: horrys@agricultura.gov.br

Summary: Considering the importance of mineral deficiency upon the cattle immunological system, this research aims to assess the effects of Cu (copper) and Zn (zinc) insufficient nutritional levels on the humoral immune response of Nelore calves, submitted to *Clostridium chauvoei* (Blackleg) vaccination. 30 calves, born from cows that had spent 18 months under different experimental diets were utilized. The Control Group (n=10) was composed of animals whose mothers received adequate mineral nutrition (10 ppm of Cu and 30 ppm of Zn, dry matter basis). The calves of Zn Insufficient Group (-Zn, n=10) and Cu Insufficient Group (-Cu, n=10) were born from cows under insufficient Zn (23 ppm) or Cu (6 ppm) nutrition. These calves were clinically accompanied until six months of life, having access to the same mineral supplementation of their mothers. In these calves first six months of life the titers of anti-*Clostridium chauvoei* antibodies, received via colostrums, was measured by ELISA assay. At 150 days old, these calves had fragments of their hepatic tissue collected for Cu and Zn levels analysis. At 180 days old, the calves received the first dose of *Clostridium chauvoei* vaccine. A second dose of this vaccine was given 36 days later. Then, the antibodies titers in response to both vaccination (five sampling times) and the serum Cu and Zn levels were also measured (three sampling times). Although Cu hepatic levels compatible with deficiency were not obtained, significant differences for these Cu levels among the three groups of calves were observed, as well as significant differences among the antibodies titers of the different groups.

Number of tables and graphs: 06 tables.

^A This present work was carried out in the *Universidade Estadual Paulista - UNESP*, Campus of Botucatu, São Paulo State, Brazil. **This work has been conducted as part of the doctorate requistes of the correspondent author.**

¹ Dept. of Veterinary Clinic – Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – FMVZ-UNESP / Botucatu – SP. Rubião Júnior District, ZIP code 18618-000.

² Department of Microbiology and Immunology – Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista – IBB-UNESP / Botucatu – SP. Rubião Júnior District, ZIP code 18618-000.

Introduction:

Mineral unbalances in soils and pastures have been responsible for low productivity amongst ruminants raised on pasture in wide areas worldwide. Very often, such effect happens despite abundant pasture resources. Copper deficiency was pointed as the most common micro minerals deficiency of cattle worldwide (McDOWELL, 1999).

As the relation between the severity of trace elements deficiency and its effects in cattle is examined, it is observed that, under marginal deficiency, the immune system is the first to suffer negative effects (MARSTON, 1999).

Cu and Zn function in the animals' immune system is directly related to the production of enzymes in the oxidative metabolism. These are responsible for the production of microbicide substances in the phagocytes "respiratory explosion", as well as reducing the harmful effect of such substances on the cellular components. This way, Cu deficiency may cause a decrease in the phagocytes functions, reduction in the interacting between T and B lymphocytes, which can also be reflected on the antibodies production (GRAHAM, 1991; CERONE et al., 1995).

According to Minatel & Carfagnini (2000), impaired neutrophil function is one of the earliest functional defects in cattle undergoing Cu depletion. Microbicidal activity, superoxide-radicals production, and SOD activity are decreased. Phagocytic neutrophils' function might be affected in ruminants with severe induced-Cu deficiency. However, macrophages appear to be less susceptible to Cu deficiency related functional decrease. Since macrophages are important not only in innate immunity but also in specific immunity as antigen-presenting cells, much work has to be done in this area. For these authors, the results indicating some effect of Cu deficiency on the humoral immune response of ruminants are inconsistent.

Clostridium chauvoei is the bacterial agent that causes Blackleg in cattle, sheep and other livestock and wild species. It is responsible for huge economic losses, mainly in regions where prophylactic measures are not adequately taken. This disease may be controlled by vaccination with inactivated bacterial cultures. The use of two-dose vaccination protocol is widely recommended for induction of anamnestic immune response in order to assure the prevention of this disease (MATTAR et al., 1999).

Considering the importance of microminerals deficiency on the cattle immune system and the need for more information about this issue, this study was outlined to assess the effects of insufficient Cu or Zn nutritional levels on the antibody response of Nelore calves to *Clostridium chauvoei* vaccination.

Materials and Methods:

Animals and characteristics of the experimental groups

30 Nelore calves, from both genders, were utilized. These calves were born from cows that had spent 18 months under adequate or Zn or Cu insufficient nutrition. The Control Group was composed of 10 animals born from cows submitted to adequate mineral nutrition. Respectively, 10 ppm/DM of Cu (parts per million = mg/kg on dry matter basis) and 30 ppm of Zn according to NRC (1996). The Zn Insufficient Group (-Zn) was composed with 10 animals born from cows with insufficient Zn supply (23 ppm) and the Cu Insufficient Group (-Cu) was composed of 10 animals born from cows with insufficient Cu supply (6 ppm). The calves were clinically accompanied from birth until six months of age. During this time, they remained with their respective mothers and had access to the same mineral supply of each group.

Mineral Supplementation

The *Brachiaria decumbens* pasture was submitted to composition analysis. The following mean values were obtained: N = 5 g/kg, P = 0.8 g/kg, K = 8 g/kg, Ca = 3 g/kg, Mg = 2.6 g/kg, S = 0.6 g/kg, B = 6 ppm, Cu = 6 ppm, Fe = 153 ppm, Mn = 278 ppm, Zn = 23 ppm, Mo = 2 ppm. It must be noted that the Cu and Zn pasture levels were below the NRC (1996) recommendations.

Based on these data and according to NRC (1996) and McDowell (1999), a mineral supplement was formulated, in order to satisfy the nutritional needs of beef cattle in the reproductive phase (TABLE 1). The mineral mixtures of each group were available to the mothers and their calves during the whole period of this experiment. The mentioned mineral supplement was offered *ad libitum* in a sheltered feeder to the animals of the Control Group. The -Zn Group received the same mixture, however, without Zn sources and the -Cu Group received the same mixture, without Cu sources.

Vaccination

The calves' mothers received, approximately 18 months before breeding, a dose of polyvalent Clostridiosis vaccine, including anti-*Clostridium chauvoei* antigens.

According to Schipper et al. (1978), in order to prevent the negative interference of residual passive antibodies, the calves were vaccinated at 180 days of age (ST6). A commercial vaccine against Blackleg¹³, obtained by the inactivation of the *Clostridium chauvoei* cultures with formalin and adsorbed on aluminum hydroxide was utilized. 36 days after vaccination (ST10), the calves received a second vaccine dose (booster).

¹³ Monovacina® Vallée S.A. Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

Performed analyses and sampling times:

Cu and Zn quantification:

Fragments of hepatic tissue were collected from calves at 150 days old (ST6) according to the adapted biopsy technique of McDowell (1999). 30 days of interval between biopsy and vaccination were obeyed.

Calves' serum samples were collected at three different sampling times. The first immediately before the vaccination (ST7), then immediately prior to the booster dose (ST10), and later on, 15 days after the booster dose, at the end of the sampling times (ST11).

For Cu and Zn quantification in both tissues samples, the technique of optical emission spectrometry with inductively coupled argon plasma generator was utilized by means of the simultaneous spectrometer¹⁴. The Asp & Lund (1992) acid digestion method was then applied for preparing the liver samples.

Anti-*Clostridium chauvoei* antibodies titration: Initially, samples collected in six different sampling times, prior to the age of six months, and prior to their first vaccination were analyzed (ST1 to ST6). This material was collected during the first week of the calves' life and, after that, on a monthly basis until five months old (ST1 a ST6). After these aforementioned sampling times, five new samples were taken, after the animals were 180 days old, mileposted by the vaccine administration. These collections were done immediately prior to the vaccine (ST7), at 15 (ST8) and 21 days after the vaccination (ST9), and then, immediately prior to the booster dose (ST10) and 15 days later (ST11).

The ELISA method for the anti-*Clostridium chauvoei* antibodies titration, proposed by Crichton et al. (1990), was chosen. The results were expressed by means of "ELISA's *index*".

- ▶ Antigen – A *Clostridium chauvoei* strain, formalin inactivated, collected from the vaccine culture medium. This bacterial strain was the same utilized for the production of the used vaccine.
- ▶ Positive Control Serum – a pool of serums collected from the Control Group calves (control / adequate diet), 15 days after the booster vaccination (ST11).
- ▶ Negative Control Serum – a pool of serum collected from calves before the colostrums nursing.
- ▶ Antibodies – Peroxidase-labeled¹⁵, rabbit anti-bovine Immunoglobulin G antibody.
- ▶ Microtitration plates – High adsorption capacity¹⁶, 96-well flat bottom.

¹⁴ BAIRD© Model ICP 2000® Massachusetts, USA

¹⁵ DakoCytomation© Glostrup, Denmark.

¹⁶ Nunc Maxisorp® Nalg Nunc International©

Statistical analysis

The “Analysis of Variance”, for a complete random experiment, was utilized for the variables assessed in one single sampling time (calves’ hepatic Zn and Cu). The F and P statistical calculus and comparisons between pairs of means were assessed by the Tukey’s method. For the variables assessed in more than one sampling time the “Profile Analysis” was utilized (MORRISON, 1967). This analysis was conducted to verify the differences among results of groups in each sampling time as well as the difference among results obtained in the sampling times of each group. For all the tested hypothesis the calculated F statistics were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion:

Calves’ hepatic Cu levels (Table 2): At 150 days old, the calves of – Zn Group presented significant higher Cu levels (434.93 ppm) than the Control Group (323.61 ppm), which have significant higher levels than the ones observed in -Cu Group (173.30 ppm).

Calves’ serum Cu levels (Table 3): There were no significant differences among the values of the three calves’ groups in any of the sampling times. Mean values of groups were 0.602 mg/L immediately before vaccine first dose (ST7); 0.684 mg/dL immediately before booster dose and 0.627 mg/dL (ST10) and 15 days after the booster vaccination (ST11). The only noteworthy occurrence was the stressed mean value obtained in the -Zn Group at the time immediately before the booster vaccination (0.809 ± 0.353 mg/dL at ST10).

Calves’ Zn hepatic level (Table 2): There were no significant differences among the Zn values of the three calves groups at 150 days old (Control group 79.78 ± 7.08 ppm; -Zn Group 79.20 ± 4.90 and -Cu Group 80.53 ± 11.11 at ST6).

Calves’ Zn serum level (Table 4): There were no significant differences among the Zn mean values of the different groups in any of the sampling times ($G1 = 1,906$; $G2 = 1,822$; $G3 = 1,606$ ppm). However, it was noted an accentuated reduction on the serum Zn mean values of the three groups at the last collection (0,578 ppm at ST11), compared to the prior sampling times (immediately before vaccine 2,224 ppm (ST7) and booster 2,532 ppm (ST10)).

ELISA index for anti-*Clostridium chauvoei* antibodies obtained via colostrums (Table 5): There were no significant differences among the anti-*C. chauvoei* antibodies titers of any groups in any of the sampling times. A sequential and significant reduction of the antibody titers is observed until the calves were four months old. Such reduction was very accentuated in the first two months of life.

ELISA index for anti-*Clostridium chauvoei* antibodies in response to the vaccination (Table 6):

The statistically lowest antibodies titers were presented by the -Cu Group at 15 days after the vaccination (0.829 ± 0.350 at ST8). There were no significant differences in the antibody titers among the Control Group and the -Zn Group at this sampling time (respectively 0.949 ± 0.248 and 0.924 ± 0.300 at ST8). Furthermore, at 21 days after the vaccine (ST9) the titers of Control Group were significantly more elevated (0.858 ± 0.234 at ST9) than the ones in -Zn Group and -Cu Group (respectively 0.696 ± 0.279 and 0.726 ± 0.333 at ST9). At 36 days after the first vaccination and immediately prior to the second dose, the antibodies titers of all the groups were statistically similar (0.565 for all groups mean at ST10). Nevertheless, 15 days after the booster vaccination we could notice the significant difference among the antibodies titers among the three groups of animals. The Control Group presented higher titers (0.827 ± 0.200 at ST11), followed by -Zn Group (0.733 ± 0.242 at ST11). The animals from -Cu Group, which had the lowest hepatic levels of such mineral, presented lower titers of anti-*C. chauvoei* antibodies at this sampling time (0.679 ± 0.201 at ST11).

Discussion:

Calves' hepatic and serum Cu levels: At 150 days old, the calves of - Zn Group presented significant higher hepatic Cu levels than the Control Group, which have significant higher levels than the ones observed in the -Cu Group. The element Zn causes an antagonistic effect in the Cu bio-availability (SUTTLE, 1986; MARSTON, 1999). Therefore, the smaller offer of Zn for the -Zn Group may have been responsible for the higher hepatic Cu levels observed in this Group, thus explaining the occurrence of superior values than the Control Group. In accordance to Graham (1991) (10 a 25 ppm), Marston (1999) (5 – 25 ppm) or McDowell (1999) (25 –75 ppm) reference values, there were not hepatic levels indicative of marginal deficiency in any of the groups at any sampling time. It is important to mention that, despite the absence of deficiency, there were significant differences in the hepatic Cu levels among the different treatment groups.

Suttle (1986) reports that the safe Cu:Mo (copper : molybdenum) dietetic rate varies in accordance to the pasture, and McDowell (1999) considers safe to maintain cattle in pastures with 6 ppm of copper when the levels of molybdenum are not higher than 1.5 ppm. Such conditions neared this experiment (Cu: 6.0 ppm; Mo: 2.0 ppm).

On the other hand, the high Fe (iron) pasture levels (153 ppm), associated to the additional Zn supply, could have contributed for the lower Cu levels of the –Cu Group. The accelerated growth rate of the animals during the assessed period was not capable of producing deficiency.

There were no significant differences among the serum Cu levels of the three calves' groups in any of the sampling times. All the serum Cu mean values of the three groups, except those ones, observed immediately before booster vaccination (ST10), may be considered as indicative of marginal deficiency, according to McDowell (1999) ($<0,65$ mg/L). If we compare the hepatic and serum copper levels with the normal values mentioned by McDowell (1999), we would notice that, despite the hepatic levels being considered adequate, the serum values fit the deficiency values. Wikse et al. (1992) indicated that serum Cu levels are more susceptible to metabolic variation and, many times, it doesn't correspond to liver copper or even to the organic Cu status.

Calves' hepatic and serum Zn levels: There were no significant differences among the Zn hepatic levels of the three calves groups. The Zn hepatic values obtained in this experiment may be considered as normal if compared with the ones described by Graham (1991) (40 – 100 ppm). According to the Underwood (1977) criteria, all the mean hepatic values, for all groups, may be considered as indicative of deficiency (<125 ppm).

There were no significant differences among the serum Zn mean values of the different groups in any of the sampling times. However, it was noted an accentuated reduction on the serum Zn mean values of the three groups at the last collection, compared to both prior sampling times. The levels observed in the last collection may be considered indicative of a marginal deficiency according to Graham (1991) (0,4 to 0,8 ppm) and Marston (1999) (0,5 to 0,6 ppm) criteria. Such reduction may have occurred due to the animals' stress, caused by the intense handling, during the last collection stage. The stress effects on the zinc serum levels had already been described by other authors (SPEARS et al. 1991; KINCAID et al., 1997).

The serum Zn levels found in the first two sampling times ranged within the normality rates as proposed by Graham (1991) (0,8 to 1,4 ppm); Marston (1999) ($> 0,6$ ppm) and McDowell (1999) ($> 0,8$ ppm).

ELISA index for anti-*Clostridium chauvoei* antibodies obtained via colostrums: There were no significant differences among the anti-*C. chauvoei* antibody titers of any groups in any of the sampling times. A sequential and significant reduction in the titers of antibodies is observed until the calves are four months old, due to the physiological catabolism of immunoglobulins. Such reduction was more accentuated in the first two months of life.

Silva (2003) has analyzed the gamma globulins levels of the same calves utilized in this present research. An accentuated decrease of these levels until the third month of life was observed ($3,02 \pm 0,98$ g/dL during the first week, significantly higher than $0,85 \pm 0,35$ g/dL at the first month, statistically higher than $0,44 \pm 0,11$ g/dL at the second month, which was statistically equivalent to $0,57 \pm 0,12$ g/dL at the third month of calves' life).

Despite the experimental diets, we can consider that, the matrixes, even the ones submitted to the Cu and Zn insufficient diets, have maintained hepatic stocks of these nutrients, which have enabled the adequate production of immunoglobins. Ward et al. (1997) haven't found significant differences among colostrums collected from heifers at parturition or on serum IgG levels of 7 day old calves that were born from heifers under insufficient or adequate Cu levels.

ELISA index for anti-*Clostridium chauvoei* antibodies in response to the vaccination:

Considering the absence of significant differences among the hepatic Zn levels or the serum Cu and Zn levels in any of the three experimental groups, in all sampling times, such observations shall be evaluated taking into account the different Cu hepatic levels. We must also take into account the fact that, despite the significant differences among the calves' hepatic Cu levels, none of the mean levels was near the indicative values for deficiency.

Several studies have investigated the effect of Cu deficiency on the humoral immune response of ruminants with different results.

Stabel et al. (1993) found in calves that received insufficient Cu diet the higher serum antibody titers to IBRV than did calves that received Cu supplement. In the same study, the authors did not find significant differences among the anti-*Pasteurella haemolytica* antibody titers of calves under insufficient or supplement Cu diets. However, calves with supplemented Cu diet tended to have higher *Pasteurella hemolytica* titers than did calves without Cu supplement. This 5 months study was conducted with 14 Holstein steers, averaging 30 days of age, submitted to an insufficient diet (1.5 ppm of Cu) or supplemented with 10 ppm of Cu. The hepatic Cu levels were significantly higher for the Cu supplemented animals (61 ± 23 ppm), compared to the group submitted to insufficient Cu nutrition ($7,4 \pm 2,5$ ppm). These hepatic Cu levels are much lower than the ones found in this present research, making difficult some direct correlation among the results. It must be noted the presence of hepatic Cu levels indicative of deficiency, according to Graham (1991) (< 10 ppm) and Marston (1999) (0.5-10 ppm). According to McDowell (1999) (25-75 ppm), even the group receiving Cu supplemented diet presented hepatic Cu levels indicative of marginal deficiency.

Ward et al. (1997) conducted an experiment to determine the effects of Cu deficiency, with or without high dietary Mo or Fe on the specific immunity of calves. These authors used 38 calves from bred heifers, fed experimental diets from the last third of gestation until the calves were weaned. Feeding diets not supplemented with Cu resulted in Cu deficiency according to Underwood (1981) plasma Cu parameters (<0.5 mg/L). Unsupplemented calves (0.30 mg/L serum Cu levels) had significant higher secondary antibody response to the second inoculation of porcine red blood cells than the Cu, Mo, or Fe supplemented groups at 14 and 21 days after vaccination (respectively 0.68 mg/L, 0.35 mg/L and 0.22 mg/L of serum Cu levels). There were no significant differences among groups at the time of the first inoculation of PRBC. The basal diet of the experiment was adjusted for 1.5 ppm of Cu and the groups were supplemented with 10 ppm of Cu; 5 ppm of Zn and 600 ppm of Fe.

Cerone et al. (1995) fed female Aberdeen Angus heifers with a diet containing Mo and sulfate for 9 months to develop a low Cu status. The animals were immunized with live S1119 *Brucella abortus*. Serum Cu concentration and activity of ceruloplasmin were decreased by the induced Cu deficiency (about 0.4 mg/L of serum copper at four months from the beginning of the treatment). Total level of immunoglobulin G and total complement concentration in serum were impaired by low Cu status. Antibody titers to *B. abortus* and proliferation of Concanavalin A were significantly lower in Cu deficient heifers than in controls. Results show that specific immune response to an intracellular pathogen may be impaired by Cu deficiency.

These previously mentioned two authors used only plasma or serum Cu values as indicator of Cu organic status and utilized supplementation with Cu antagonists in order to induce deficiency. These points are different from the methodology adopted in this present research and may have adversely influenced the results interpretation of these works.

Dorton et al. (2003) used 48 purebred Angus steers, about 7 months of age, to determine the effects of Cu source and concentration on immune function. Steers were fed a diet containing 7.1 ppm of Cu for 56 days, then switched to a diet containing 6.1 ppm of Cu for 144 days. 14 days after the first inoculation of porcine red blood cells (PRBC) the groups supplemented with 10 ppm of Cu had the highest antibody titers, even higher than the groups supplemented with 20 ppm of Cu. 14 days after the second dose of PRBC the groups supplemented with 20 ppm of Cu had higher antibody titers than the groups supplemented with 10 ppm and the unsupplemented group. However, 21 days after the second PRBC inoculation, the antibody titers of the unsupplemented group were higher than the supplemented ones.

On the other hand, steers receiving 20 ppm of Cu had higher specific antibody titers to OVA (ovalbumin) than steers receiving 10 ppm of Cu at 14 or 21 days after OVA inoculation. Steers receiving 20 ppm of Cu from organic sources had higher anti-OVA specific antibody titers than steers supplemented with the same amount of Cu, derived from CuSO₄. The unsupplemented steers had the lower anti-OVA antibody titers. The liver Cu levels of the groups at 112 days of the experiment, when received the second dose of PRBC and the unique inoculation of OVA were: Unsupplemented group - 37,4 ppm (marginal deficiency according to Mc Dowell (1999) (25-75 ppm); Group 10 ppm of Cu - 113,9 ppm; Group 20 ppm of Cu - 116,9; Group 10 ppm of Cu from organic sources – 94,8 and Group 20 ppm of Cu from organic sources: 194,6 9 (adequate according to Underwood (1991); Marston (1999); Mc Dowell (1999)). For the authors, the results suggested that the effect of Cu supplementation on the immune response are variable and depend on the class of immune cell being studied as well as the source and concentration of Cu supplementation. B cell stimulated primary and secondary immune responses tended to be enhanced by Cu supplementation. When a more antigenic antigen was administered the higher Cu supplementation induced higher antibody titers. They also mentioned that the differences among results of other researchers have influences of the type of antigenic stimulation. These authors attributed importance to the use of “Freund’s Incomplete Adjuvant” to improve the antigenic effect of OVA by inducing the granuloma formation and a better antigen processing and presentation to T-cells.

In this present work there were not Cu levels indicative of deficiency. However, the -Cu Group, with significant lower hepatic Cu levels, had the significant lower antibody titers among the three groups. Although the Cu hepatic levels of the -Zn Group were the highest, the antibody titers of this Group were significant lower than the observed on the Control Group, under adequate diet. These results indicate the advantage of an adequate and well-balanced mineral nutrition in order to prevent immune dysfunctions. It is important to mention that hepatic Cu levels observed in this present study, even in the animals under Cu insufficient diet, are much higher (173.30 ± 51.54 ppm) than the marginal deficiency references of Mc Dowell (1999) (27 – 75 ppm) or Marston (1999) (5 – 25 ppm) and Graham (1991) (10 – 25 ppm). In the same way, the high hepatic Cu levels, reached by the -Zn Group, possibly because of the absence of Zn antagonism, may cause some negative effect on the antibody production. The extremely high Cu levels of the -Zn Group animals could reduce the bioavailability of other minerals, such as Se and Mn that also have an important rol in immune response. It must be noted that other researchers have found lower antibody titers in Cu supplemented groups when compared to cattle under insufficient Cu supply and even to deficient ones. In addition, it is possible that the measured Zn values of this present work did not

indicate accurately the calves' Zn status or reflected the metabolic functions of this mineral. It must be noted that these aforementioned mineral values weren't induced by heavily supplementation with Cu absorption antagonists. Those conditions made difficult the direct comparison among other researchers' results.

Conclusions:

- The diets utilized during the experiment did not cause Cu hepatic levels that indicated deficiency. Despite this, the serum levels of Cu were compatible with Cu deficiency.
- There were no significant differences between the titles of anti-*Clostridium chauvoei* passive antibodies between the three calves' groups, thus demonstrating the absence of treatments effect on the matrixes' colostrums immunoglobins production.
- Despite not having noticed Cu levels compatible with deficiency, the different Cu hepatic levels were reflected on the production of antibodies in response to the anti-*Clostridium chauvoei* vaccine.

References

- Asp, T.N., and W. Lund, 1992: Elemental analysis of bovine liver by inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry by using a simple dissolution procedure. *Talanta*. **39**, 563-566.
- Cerone, S.I., S.A. Sansinanea, and N.J. Auza, 1995: Copper deficiency alters the immune response of bovine. *Nutr. Res.* **15**, 1333-41.
- Crichton, R., J. Solomon, and A. M. Barton, 1990: The development of na Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Measuring the Poteny of Vaccines Containing *Clostridium chauvoei* antigens. *Biologicals*. **18**, 49-54.
- Dorton, K.L., T. Engle, D. Hamar, P. Siciliano, R. Yemm, 2003: Effects of copper source and concentration on copper status and immune function in growing and finishing steer. *Anim. Feed Sci. Tech.* **110**, 31-44.
- Graham, T. H., 1991: Trace element deficiencies in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **7**, 153-215.

Kincaid, R.L., B. Chew, J. Cronrath, 1997: Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: effects on uptake and immunity. J. Dairy Sci. **80**, 1381-8.

Mattar, M.A., T. Cortiñas, M. Di GENARO, et al., 1999: Immunogenic power of cellular and extracellular antigens of *Clostridium chauvoei* strain isolated in San Luis, Argentina. Anaerobe. England, **5**, 295-6.

Marston, T., 1999: Trace mineral supplementation in beef cattle. Part I. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. **21**, 21-7.

McDowell, L.R., 1999: Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil. 3.ed. University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida.

Minatel, L., J. Carfagnini 2000: Copper deficiency and immune response in ruminants. Nut. Res., **20**, 1519-29.

Morrison, D.F., 1967: Multivariate statistical methods. 2. ed. Mc Graw Hill, New York .

National Research Council, 1996: Nutrient requeriment of beef cattle. 7.ed. National Academy Press, Washington.

Schipper, I.A.; L.C. Kelling, and J. Mayer, 1978: Effects of passive immunity on immune response in calves vaccinated against *Clostridium chauvoei* infection. Vet. Med. Small Anim. Clin. **78**, 1564-6.

Silva, H.F. Avaliação da bioquímica clínica de bezerros Nelore, nascidos de vacas em dieta adequada ou insuficiente em cobre ou zinco e mantidos sob a mesma nutrição mineral de suas mães até os seis meses de idade. 2003: 149p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Spears, J.W., R. Harvey, T. Brown, 1991: Effects of zinc methionine and zinc oxide on performance, blood characteristics, and antibody titers response to viral vaccination in stressed feeder calves. J. Am. Vet. Medical Assoc. **199**, 1731-3.

Stabel, J.R, J. Spears, T. Brown. 1993: Effect of copper deficiency on tissue blood characteristics, and immune function calves challenged with infectious bovine rhinoracheitis virus *Pasteurella haemolytica*. J. Anim. Sci. **71**, 1247-55.

Suttle, N. F., 1986: Copper deficiency in ruminants; recent developments. Vet. Rec., **119**, 519-522.

Underwood, E. J., 1997: Trace elements in human and animal nutrition. 4.ed. New York: Academic Press, 1977.

Ward, J. D., G. Gengelbach, J. Spears. 1997: The effects copper deficiency with or without high dietary iron or molybdenum on immune function of cattle. J. Anim. Sci., **75**, 1400-08.

Wikse, S.E.; D. Herd; R. Field; et al. 1992. Diagnosis of copper deficiency in cattle. J. Amer. Vet Med Assoc. , **200**, p. 1625-9.

Table 01. Mineral supplement composition. based on pasture mineral analysis.

Mineral Supplement	P (%)	Cu (%)	Zn (%)	Co (%)	Na Cl (%)	Se (%)
Control Group	68	0.625	0.765	0.007	30.6	0.003
-Zn Group	68	0.625	0	0.007	31.365	0.003
-Cu Group	68	0	0.765	0.007	31.225	0.003
Source	Bicálcium Fosfate	CuSO ₄	ZnSO ₄	CoSO ₄	NaCl	Sodium Selenite

Mean values followed by equal capital letters do not differ significantly between the groups.

Mean values followed by equal small letters do not differ significantly between the sampling times.

Table 02. Mean values and standard deviations of hepatic Copper and Zinc levels (ppm) of Nelore calves under different treatments at 150 days old (ST6).

Groups		Hepatic Cu (ppm)	Hepatic Zn (ppm)
Control Group (n=10)	Means	323.61 ^B	79.78 ^A
	s	± 26.73	± 7.08
-Zn Group (n=10)	Means	434.93 ^A	79.20 ^A
	s	± 211.56	± 4.90
-Cu Group (n=10)	Means	173.30 ^C	80.53 ^A
	s	± 51.54	± 11.11
Groups' Mean values		310.62	79.84
		± 163.78	± 7.90

Mean values followed by equal capital letters do not differ significantly between the groups.

Mean values followed by equal small letters do not differ significantly between the sampling times.

Table 03. Mean values and standard deviations of the serum Copper levels (ppm) in Nelore calves under different treatments and sampling times (ST7, ST10 e ST11).

Groups		ST7 Vaccine	ST10 Booster	ST11 15 days after booster	Groups' Means
Control Group (n=10)	Means	0.621 ^{Aa}	0.642 ^{Aa}	0.660 ^{Aa}	0.641
	s	± 0.112	± 0.121	± 0.181	
-Zn Group (n=10)	Means	0.604 ^{Ab}	0.809 ^{Aa}	0.593 ^{Ab}	0.669
	s	± 0.110	± 0.353	± 0.161	
-Cu Group (n=10)	Means	0.581 ^{Aa}	0.600 ^{Aa}	0.629 ^{Aa}	0.603
	s	± 0.085	± 0.052	± 0.104	
Groups' Mean values		Means s	0.684	0.627	

Mean values followed by equal capital letters do not differ significantly among the groups.

Mean values followed by equal small letters do not differ significantly among the sampling times.

Table 04. Mean values and standard deviations of the serum Zinc levels (ppm) in Nelore calves under different treatments and sampling times (ST7, ST10 e ST11).

Groups		ST7 Vaccine	ST10 Booster	ST11 15 days after booster	Groups' Means
Control Group (n=10)	Means	2.142 ^{Aa}	2.706 ^{Aa}	0.871 ^{Ab}	1.906
	s	± 1.791	± 0.960	± 0.856	
-Zn Group (n=10)	Means	2.281 ^{Aa}	2.784 ^{Aa}	0.401 ^{Ab}	1.822
	s	± 2.265	± 0.939	± 0.508	
-Cu Group (n=10)	Means	2.249 ^{Aa}	2.106 ^{Aa}	0.463 ^{Ab}	1.606
	s	± 1.366	± 0.383	± 0.594	
Groups' Mean values		2.224	2.532	0.578	

Mean values followed by equal capital letters do not differ significantly between the groups.

Mean values followed by equal small letters do not differ significantly between the sampling times.

Table 05. Mean values and standard deviations of the ELISA index for anti-*Clostridium chauvoei* antibodies (passive) of Nelore calves under different treatments and sampling times (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 and ST6).

Groups		ST1 1 week	ST2 1 month	ST3 2 month	ST4 3 month	ST5 4 month	ST6 5 month	Groups' Means
Control Group (n=10)	Means	1.018 ^{Aa}	0.452 ^{Ab}	0.116 ^{Ac}	0.080 ^{Ad}	0.016 ^{Ae}	0.012 ^{Ae}	0.282
	s	± 0.360	± 0.351	± 0.115	± 0.073	± 0.020	± 0.038	
-Zn Group (n=10)	Means	0.962 ^{Aa}	0.358 ^{Ab}	0.065 ^{Ac}	0.031 ^{Ad}	0.015 ^{Ae}	0.014 ^{Ae}	0.240
	s	± 0.418	± 0.139	± 0.048	± 0.029	± 0.025	± 0.030	
-Cu Group (n=10)	Means	1.019 ^{Aa}	0.332 ^{Ab}	0.111 ^{Ac}	0.089 ^{Ad}	0.022 ^{Ae}	0.019 ^{Ae}	0.265
	s	± 0.413	± 0.238	± 0.187	± 0.105	± 0.050	± 0.046	
Groups' Mean values		0.999	0.380	0.097	0.066	0.018	0.015	

Mean values followed by equal capital letters do not differ significantly between the groups.

Mean values followed by equal small letters do not differ significantly between the sampling times.

Table 06. Mean values and standard deviations of the ELISA index for anti-*Clostridium chauvoei* antibodies (vaccine) of Nelore calves under different treatments and sampling times (ST7. ST8. ST9. ST10 and ST11).

Groups		ST7 Vaccine	ST8 15 days after	ST9 21 days after	ST10 Booster	ST11 15 days after booster	Groups' Mean
Control Group (n=10)	Means s	0.028 ^{Ad} ± 0.044	0.949 ^{Aa} ± 0.248	0.858 ^{Ab} ± 0.234	0.580 ^{Ac} ± 0.194	0.827 ^{Ab} ± 0.200	0.648
-Zn Group (n=10)	Means s	0.047 ^{Ad} ± 0.054	0.924 ^{Aa} ± 0.300	0.696 ^{Bb} ± 0.279	0.538 ^{Ac} ± 0.270	0.733 ^{Bb} ± 0.242	0.587
-Cu Group (n=10)	Means s	0.020 ^{Ad} ± 0.027	0.829 ^{Ba} ± 0.350	0.726 ^{Bb} ± 0.333	0.578 ^{Ac} ± 0.264	0.679 ^{Cb} ± 0.201	0.566
Groups' Means values		0.030	0.901	0.760	0.565	0.746	-

Means values followed by equal capital letters do not differ significantly between the groups.

Means values followed by equal small letters do not differ significantly between the sampling times.