



## Transferência de imunidade passiva e proteinograma sérico até os 35 dias de vida em bezerros da raça Nelore concebidos naturalmente ou produtos da fecundação *in vitro*

Passive Transfer of Immunity and Serum Proteinogram during the First 35 Days of Age in Nelore Calves Conceived Naturally or Through *In Vitro* Fertilization

Júlio Augusto Naylor Lisboa<sup>1</sup>, Tiago Torrecillas Sturion<sup>2</sup>,  
Mayara Cardoso dos Anjos<sup>1</sup> & Karina Keller Marques da Costa Flaiban<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Some reports indicate that calves produced by *in vitro* fertilization (IVF) may have excessive birth weights, increasing the rates of dystocia. Prolonged labor can cause the birth of lethargic calves that slowly ingest colostrum; this may compromise the intestinal absorption of immunoglobulins. Although the number of beef calves produced by IVF is high in Brazil, there have been few physiological studies examining the neonatal period in such cases. The aim of this study was to evaluate the passive transfer of immunity, and characterize the variation in serum protein concentrations, in Nelore calves up to 35 days of age, comparing naturally conceived calves with those conceived by IVF.

**Materials, Methods & Results:** Forty healthy newborn Nelore calves were randomly selected and allocated into two groups (n = 20) according to their method of conception (natural versus IVF), and each group was composed of ten males and ten females. All calves were born and raised on the same farm, and kept with their mothers on extensive management condition. Blood samples were collected between 24 and 36 h after birth, and at 7, 14, 21, 28, and 35 days of age. Total protein (TP) concentration in serum was measured by the biuret method, and gamma-glutamyl transferase (GGT) serum activity was measured by the kinetic method. Concentrations of serum albumin, as well as alpha 1-, alpha 2-, beta, and gamma globulins were measured by agarose gel electrophoresis. Serum immunoglobulin G (IgG) concentration was estimated by the zinc sulfate turbidity test. The effects of sex, age, and conception method, on aforementioned serum parameters, were tested by repeated measures ANOVA. Sex of calves did not affect the studied variables ( $P > 0.05$ ) and there was no interaction between the age and the conception method ( $P > 0.05$ ). Naturally conceived calves presented higher TP and IgG concentrations ( $P < 0.05$ ), and lower concentrations of alpha 1- and alpha 2-globulins ( $P < 0.05$ ), than that of those conceived by IVF. Age exerted greater influence on the serum parameters in the two groups. Serum concentrations of TP ( $P < 0.05$ ), beta globulin ( $P < 0.05$ ), gamma globulin ( $P < 0.001$ ), IgG ( $P < 0.01$ ), and globulins ( $P < 0.001$ ), as well as serum activity of GGT ( $P < 0.0001$ ) were high at 24 to 36 h after birth, and decreased with age. Albumin concentration, however, increased ( $P < 0.01$ ) in the first weeks of life. The variation in alpha 2-globulin concentration was discrete ( $P < 0.05$ ), and the serum concentration of alpha 1-globulin did not change ( $P > 0.05$ ) with age. These patterns of variation related to age were observed in both groups with no apparent distinctions. Based on values obtained at 24 to 36 h after birth, it can be asserted that the passive transfer of immunity was successful in both groups, despite the differences in total protein and IgG concentrations.

**Discussion:** The age-related variations in serum proteinogram components over the first 35 days of age may be considered physiological; and were consistent with previous studies in healthy Nelore calves. These were characterized by gradual decreases in TP, gamma globulins, IgG, and globulin concentrations, as well as GGT activity, and by increase in albumin concentration. The results do not corroborate the suspicion that calves conceived by IVF are more prone to failure of passive transfer. It can be concluded that Nelore newborn calves conceived through IVF, having standard weight at birth, do not have physiological differences related to serum protein concentrations when compared to calves conceived by natural methods.

**Keywords:** cattle, gamma globulins, IgG, newborn, *in vitro* embryo production.

**Descritores:** bovinos, gamaglobulinas, IgG, neonatos, produção de embriões *in vitro*.

Received: 17 June 2016

Accepted: 24 November 2016

Published: 28 December 2016

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil. <sup>2</sup>Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), Ourinhos, SP, Brazil. CORRESPONDENCE: J.A.N. Lisboa [janlisboa@uel.br - Tel.: +55 (43) 3371-4319]. Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Campus Universitário, Caixa Postal 10011. CEP 86057-970 Londrina, PR, Brazil.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de embriões *in vitro* e isso se deve à participação da raça Nelore, reconhecida pela melhor qualidade dos oócitos recuperados para utilização na fecundação *in vitro* (FIV) [12]. Apesar de a biotécnica permitir o avanço do melhoramento genético, há relatos de alguns problemas, como tempo de gestação prolongado [25], aumento da mortalidade pré-natal e peso corpóreo elevado ao nascimento, que, juntos, definem a “Síndrome do Bezerro Grande” [31,33].

O maior índice de distocia observado ao nascimento de bezerros produtos de FIV [2,10] pode provocar letargia no recém-nascido e demora em ingerir o colostro [22]. Além disso, a maior intensidade da acidose metabólica presente compromete a absorção intestinal de imunoglobulinas [3], aumentando a chance de ocorrer falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) [11].

Dentre os estudos brasileiros relacionados aos bezerros produtos de FIV [10,11,20,21,28,29], a transferência de imunidade passiva (TIP) foi investigada em somente dois deles [11,21]. A comparação da TIP entre bezerros produtos de FIV e produtos de concepção natural foi realizada uma única vez, envolvendo animais da raça Brahman e se limitando à mensuração das proteínas séricas no final do primeiro dia de vida [21]. Apesar da importância da raça Nelore, estudos sobre a TIP e sobre o proteinograma sérico ainda não foram realizados em bezerros dessa raça produtos de FIV.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a TIP em bezerros da raça Nelore e de caracterizar a variação das proteínas séricas ao longo dos primeiros 35 dias de vida, estabelecendo comparação entre animais frutos de concepção natural e originários de FIV.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em uma propriedade rural localizada no município de Santo Antônio da Platina, PR. Foram selecionados quarenta bezerros sadios da raça Nelore, os quais foram agrupados em dois grupos (n = 20) de acordo com método de concepção: natural (monta natural ou inseminação artificial) ou artificial por meio da fecundação *in vitro* (FIV) e cada grupo foi composto por 10 machos e 10 fêmeas. Os bezerros produtos de FIV eram filhos de 12 vacas diferentes, das quais foram obtidos oócitos por punção ovariana guiada por ultrassonografia. Os métodos empregados para a produção de embriões *in vitro*, envolvendo as etapas de maturação dos oócitos, de fecundação dos oócitos e de

cultivo após a fecundação, obedeceram ao protocolo tradicional descrito [24]. Os embriões obtidos por fecundação *in vivo* foram transferidos, a fresco, para fêmeas receptoras previamente sincronizadas. As receptoras eram fêmeas 1/2 sangue Nelore, frutos de cruzamento com raças Pardo Suíça, Simental ou Red Angus. Nesse estudo não foram incluídos gêmeos e não houve indução do parto das receptoras.

Independentemente do método de concepção, os partos acontecerem em piquetes próprios para observação e, após o parto, os bezerros permaneceram em contato direto com as suas mães e realizaram a mamada natural do colostro. Todos os animais foram mantidos em regime de manejo extensivo em pastagens *Brachiaria brizantha* ou de grama Estrela roxa (*Cynodon nlenfuensis*) com oferta permanente de água e de sal mineralizado comercial (Guabiphós 90 Cria)<sup>1</sup> à vontade. Os bezerros e suas mães permaneceram sob vigilância regular (de três a quatro vezes por dia) durante todo o período de duração do experimento.

Os bezerros foram examinados em seis idades, atestando-se a higidez dos mesmos antes da realização da colheita de amostras: entre 24 e 36 h após o nascimento e aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de vida. As amostras de sangue foram colhidas de cada bezerro por meio de punção da veia jugular externa com agulha 25x0,8 mm e tubo do sistema de colheita a vácuo sem anticoagulante. O soro sanguíneo foi obtido por centrifugação após a retração do coágulo e foi conservado por congelamento (-20°C) até o momento das análises.

A concentração de proteínas séricas foi determinada pelo método do biureto [14] utilizando-se reagentes comerciais (Proteínas Totais PP)<sup>2</sup> e leitura espectrofotométrica (Chemistry Analyser CA-2005)<sup>3</sup>. A atividade da gamaglutamiltransferase foi determinada pelo método cinético segundo a técnica de Szasz modificada [30], empregando-se reagentes comerciais (Gama GT)<sup>2</sup> e leitura espectrofotométrica<sup>3</sup>. As concentrações séricas das frações proteicas albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gamaglobulinas foram determinadas por eletroforese [17]. Empregou-se gel de agarose (Celmigel de Agarose Geral)<sup>4</sup>, tampão Tris de pH 9,5<sup>4</sup> e corrida eletroforética por 20 min em corrente de 100V (Sistema para Eletroforese SE-250)<sup>4</sup>. Após o procedimento, o gel foi corado com negro de amido 2% e descorado com ácido acético 5%. A proporção de cada fração proteica foi estabelecida por meio do programa de informática (SDS-60 do Sistema SE-250)<sup>4</sup> após leitura realizada em *scanner*.

A concentração sérica de imunoglobulinas G (IgG) foi estimada pela técnica de turvação pelo sulfato de zinco com leitura espectrofotométrica, conforme o método empregado por Pfeiffer *et al.* [23] com modificações. O volume de 0,1 mL de soro foi adicionado a 6 mL de uma solução contendo 208 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  por litro de água destilada. Após uma h em repouso, a absorvância da mistura foi mensurada por espectrofotometria (Espectrofotômetro E 225-D)<sup>4</sup> em comprimento de onda de 620 nm. Devido à instabilidade da reação foram realizadas três leituras e considerada a média das mesmas. A concentração da IgG foi estimada com o uso de uma curva padrão previamente traçada com concentrações conhecidas de IgG bovina (Single Radial Immunodiffusion Kit)<sup>5</sup>, a saber: zero (soro fetal bovino), 400, 800, 1.600 e 3.200 mg/dL. As amostras que superaram o valor de 3.200 mg/dL foram processadas novamente após diluição do soro com água destilada na proporção de 1:1.

A análise de variâncias de medidas repetidas bifatorial foi empregada inicialmente para testar os efeitos do fator idade, do fator sexo e a interação entre os dois. Em seguida, a análise de variâncias de medidas repetidas bifatorial foi empregada para testar os efeitos do fator idade, do fator tipo de concepção (natural x FIV) e a interação entre os dois. Quando a estatística F resultou significativa, o teste de Tukey foi utilizado para comparação entre as médias. Admitiu-se a probabilidade de erro de 5%. O programa de informática *SigmaStat for Windows 3.1* foi empregado para a realização da análise estatística.

## RESULTADOS

O sexo dos bezerros não exerceu efeito sobre as variáveis estudadas ( $P > 0,05$ ) e esse fator foi desconsiderado na análise final dos resultados. Não houve interação entre os fatores idade e método de concepção ( $P > 0,05$ ), e a idade foi o fator que exerceu a maior influência nos resultados. Quanto ao método de concepção, os bezerros concebidos naturalmente exibiram valores de PT e de IgG mais elevados ( $P < 0,05$ ) do que os produtos de FIV e concentrações de alfa 1 e de alfa 2 globulinas mais reduzidas ( $P < 0,05$ ). Exceto a concentração de alfa 1 globulina ( $P > 0,05$ ), todas as variáveis estudadas apresentaram variações relacionadas com a idade (Tabela 1). Em ambos os grupos estudados observou-se o mesmo comportamento: as concentrações séricas de PT ( $P < 0,05$ ), de betaglobulina ( $P < 0,05$ ),

de gamaglobulina ( $P < 0,001$ ), de IgG ( $P < 0,01$ ) e de globulinas ( $P < 0,001$ ), assim como a atividade sérica da GGT ( $P < 0,0001$ ), eram elevadas no final do primeiro dia de vida e diminuíram com o avanço da idade. A concentração de albumina, ao contrário, foi menor ao nascimento e se elevou nas primeiras semanas de vida ( $P < 0,01$ ). A fração alfa 2 globulina apresentou variações pouco expressivas no período estudado ( $P < 0,05$ ). Por fim, a relação entre as concentrações de albumina e de globulina (A:G), reduzida ao final do primeiro dia de vida, elevou-se ao longo dos primeiros 35 dias ( $P < 0,001$ ), invertendo-se aos 14 dias de idade nos bezerros concebidos naturalmente e aos sete dias de idade nos bezerros concebidos por FIV (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

As concentrações de PT, de gamaglobulina e de IgG estimada e a atividade da GGT obtidas às 24 h de vida comprovam que a TIP foi bem sucedida nos bezerros estudados, independente do método de concepção, natural ou artificial *in vitro*. Os valores observados para essas variáveis ultrapassam, em muito, os limites mínimos admitidos como indicadores de FTIP ou não, ainda que esses possam variar entre os autores [8,13,19]. O fato de os bezerros produtos de concepção natural possuírem valores de PT e de IgG maiores dos que os produtos de FIV não deve ser interpretado como indício de que tenham absorvido imunoglobulinas colostrais com maior eficiência. De fato, a diferença entre as concentrações séricas dessas variáveis é pequena às 24 h de idade nos dois grupos de bezerros do estudo e passa a ser maior a partir dos 14 dias de vida. O conjunto dos resultados sustenta a afirmação de que os bezerros produtos de FIV absorveram as imunoglobulinas colostrais com eficiência tão boa quanto os bezerros concebidos naturalmente, reforçando observação prévia em bezerros da raça Brahman [21] e em bezerros ½ sangue HPB [1].

Os valores observados para as variáveis estudadas são, de forma geral, compatíveis com os já estabelecidos em bezerros da raça Nelore recém-nascidos [4,6,8,18], e os bezerros produtos de FIV não exibiram nenhuma diferença em particular. Como verificado anteriormente, bezerros Nelore com TIP bem sucedida podem apresentar, ao término do primeiro dia de vida, concentrações de gamaglobulinas e de IgG muito elevadas e superiores aos valores observados em bezerros HPB [32].

**Tabela 1.** Variação ( $x \pm s$ ) das proteínas e da atividade da gama glutamiltransferase no soro sanguíneo de bezerros Nelore saudáveis, concebidos naturalmente ou por fertilização *in vitro*, ao longo dos primeiros 35 dias de vida.

Variável	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
Bezerros produtos de concepção natural (n = 20)						
PT (g/dL)	7,10 ± 1,39 <sup>a</sup>	6,46 ± 1,05 <sup>b</sup>	6,31 ± 0,90 <sup>b</sup>	5,96 ± 0,87 <sup>bc</sup>	5,77 ± 0,62 <sup>c</sup>	5,69 ± 0,57 <sup>c</sup>
Alb (g/dL)	2,51 ± 0,45 <sup>c</sup>	2,90 ± 0,43 <sup>b</sup>	3,24 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,37 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,38 <sup>a</sup>
Alfa 1 (g/dL)	0,49 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,07 <sup>a</sup>
Alfa 2 (g/dL)	0,38 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,39 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,48 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,11 <sup>ab</sup>
Beta (g/dL)	0,75 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,23 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,17 <sup>ab</sup>	0,62 ± 0,16 <sup>bc</sup>	0,60 ± 0,14 <sup>bc</sup>	0,56 ± 0,13 <sup>c</sup>
Gama (g/dL)	2,96 ± 1,65 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,97 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,65 <sup>bc</sup>	1,11 ± 0,66 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,39 <sup>c</sup>	0,91 ± 0,42 <sup>c</sup>
IgG (g/dL)	4,18 ± 1,68 <sup>a</sup>	3,58 ± 1,12 <sup>ab</sup>	3,75 ± 1,01 <sup>ab</sup>	3,56 ± 1,09 <sup>ab</sup>	3,35 ± 0,84 <sup>b</sup>	3,29 ± 0,61 <sup>b</sup>
Glob (g/dL)	4,60 ± 1,76 <sup>a</sup>	3,55 ± 1,17 <sup>b</sup>	3,03 ± 0,87 <sup>bc</sup>	2,62 ± 0,86 <sup>c</sup>	2,47 ± 0,59 <sup>c</sup>	2,40 ± 0,59 <sup>c</sup>
Alb:Glob	0,68 ± 0,41 <sup>d</sup>	0,96 ± 0,48 <sup>c</sup>	1,17 ± 0,49 <sup>ab</sup>	1,43 ± 0,57 <sup>ab</sup>	1,41 ± 0,46 <sup>ab</sup>	1,45 ± 0,46 <sup>a</sup>
GGT (UI/L)	2569,4 ± 739,1 <sup>a</sup>	767,6 ± 407,4 <sup>b</sup>	420,0 ± 269,6 <sup>b</sup>	259,6 ± 209,6 <sup>b</sup>	165,4 ± 173,8 <sup>c</sup>	116,1 ± 149,8 <sup>c</sup>
Bezerros produtos de fertilização <i>in vitro</i> (n = 20)						
PT (g/dL)	6,81 ± 1,18 <sup>a</sup>	6,48 ± 0,94 <sup>ab</sup>	6,00 ± 0,80 <sup>bc</sup>	5,98 ± 0,82 <sup>bc</sup>	5,89 ± 0,57 <sup>c</sup>	5,80 ± 0,61 <sup>c</sup>
Alb (g/dL)	2,79 ± 0,39 <sup>b</sup>	3,20 ± 0,40 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,47 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,46 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,45 <sup>a</sup>
Alfa 1 (g/dL)	0,52 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,09 <sup>a</sup>
Alfa 2 (g/dL)	0,43 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,50 ± 0,19 <sup>ab</sup>	0,56 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,11 <sup>ab</sup>
Beta (g/dL)	0,82 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,18 <sup>bc</sup>	0,66 ± 0,15 <sup>bc</sup>	0,62 ± 0,13 <sup>c</sup>
Gama (g/dL)	2,22 ± 1,12 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,64 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,45 <sup>bc</sup>	0,85 ± 0,40 <sup>c</sup>	0,79 ± 0,31 <sup>c</sup>	0,70 ± 0,31 <sup>c</sup>
IgG (g/dL)	3,17 ± 0,83 <sup>a</sup>	2,87 ± 0,72 <sup>ab</sup>	2,57 ± 0,73 <sup>b</sup>	2,49 ± 0,73 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,73 <sup>b</sup>	2,42 ± 0,67 <sup>b</sup>
Glob (g/dL)	4,01 ± 1,23 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,74 <sup>b</sup>	2,85 ± 0,58 <sup>bc</sup>	2,68 ± 0,60 <sup>c</sup>	2,55 ± 0,61 <sup>c</sup>	2,38 ± 0,46 <sup>c</sup>
Alb:Glob	0,76 ± 0,29 <sup>c</sup>	1,03 ± 0,24 <sup>d</sup>	1,14 ± 0,27 <sup>cd</sup>	1,28 ± 0,32 <sup>bc</sup>	1,39 ± 0,39 <sup>ab</sup>	1,49 ± 0,34 <sup>a</sup>
GGT (UI/L)	1184,3 ± 644,3 <sup>a</sup>	574,0 ± 411,9 <sup>b</sup>	319,3 ± 328,4 <sup>bc</sup>	83,6 ± 83,7 <sup>c</sup>	48,2 ± 26,1 <sup>c</sup>	43,6 ± 35,1 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as idades.

Justificando o sucesso observado para a TIP em ambos os grupos, deve-se destacar que os bezerros estudados apresentaram vitalidade boa e comportamento e atitudes normais para a raça logo após o parto, não sendo percebidas diferenças entre os produtos de FIV e os concebidos naturalmente. Nenhum bezerro manifestou letargia e não houve demora em adotarem posição quadrupedal, para conseguirem caminhar e para realizarem a primeira mamada de colostro dentro das cinco primeiras horas de vida.

Como já publicado anteriormente [29], os bezerros estudados produtos de FIV nasceram ligeiramente mais pesados (4,5 kg a mais em média) do que os concebidos naturalmente, mas não se observou a ocorrência de peso excessivo ao nascimento que pudesse caracterizar a Síndrome do Bezerro Grande, condição patológica que já foi relatada em bezerros concebidos por métodos artificiais [7,31,33], incluindo os da raça Nelore [10]. Trabalhando com bezerros da raça Brahman, Oliveira [21] também verificou que os

produtos de FIV nasceram, em média, 3 kg mais pesados do que os produtos de inseminação artificial.

Trinta e quatro bezerros incluídos nesse estudo nasceram por parto fisiológico e a duração da gestação não foi prolongada nas fêmeas que pariram produtos de FIV. O auxílio ao parto foi necessário em somente seis ocasiões (quatro partos de bezerros concebidos por FIV e dois por meio natural), empregando-se tração manual com a força de um ou de dois homens. Isso contraria observações prévias de frequência relativamente elevada de partos distócicos para o nascimento de bezerros Brahman [21] e de bezerros Nelore [10] produtos de FIV. No caso dos bezerros Brahman, a duração da gestação foi uma semana maior em média para as vacas que receberam embriões fecundados *in vitro*, comparadas às que foram submetidas à inseminação artificial [21]. No rebanho em que se realizou o estudo, a distocia é um evento raro e a indução de parto nas receptoras de embriões produzidos *in vitro* não é praticada porque as gestações prolongadas são infrequentes. Conforme já

comprovado, a composição do meio em que o embrião permanece *in vitro* provoca o efeito decisivo sobre o aumento do peso ao nascimento e sobre o risco maior de distocia [15]. O tipo de protocolo laboratorial adotado pela empresa que realiza a produção de embriões *in vitro* pode justificar, portanto, porque esses eventos são mais frequentes em algumas propriedades e não em outras. O método empregado para a produção *in vitro* no rebanho estudado [24] é rotineiramente utilizado e seguro, sendo associado com a probabilidade quase nula de ocorrência desses tipos de problema.

De qualquer forma, fatores importantes que poderiam comprometer a eficiência da absorção intestinal das imunoglobulinas colostrais, tais como parto distócico prolongado [11], acidose grave com manifestação de letargia ao nascimento [3,22], extremos de peso ao nascimento, gemelaridade e indução do parto com o uso de corticosteroides na vaca foram, propositadamente, anulados no presente trabalho. Isso permitiu a comparação mais fidedigna da TIP entre os bezerros produtos de FIV e os produtos de concepção natural.

Assim como a TIP foi bem sucedida, os bezerros incluídos no estudo permaneceram saudáveis durante todo o período de duração do mesmo, compreendendo as cinco primeiras semanas de vida [29]. Os valores e as variações etárias dos componentes do proteinograma sérico podem ser considerados fisiológicos, portanto, e são coerentes com relatos anteriores em bezerros das raças Nelore [4,32], Canchim-Nelore [26,27], Limousin [4] e HPB [9,32]. O padrão de variação é o mesmo nos dois grupos estudados e não há particularidades aparentes nos bezerros concebidos por FIV. Até mesmo os valores distintos das frações alfa 1 e alfa 2 globulinas, ligeiramente menores nos bezerros produtos de concepção natural, não podem caracterizar distinção consistente entre os grupos, em virtude da pequena magnitude da diferença. Essencialmente, as variações observadas são as decorrentes de eventos fisiológicos esperados para os bezerros e não caracterizam diferenças biológicas que possam ser relacionadas ao método pelo qual foram concebidos.

Os principais eventos fisiológicos que determinam as variações do proteinograma no primeiro mês de vida estão relacionados às gamaglobulinas, especialmente a IgG, e à albumina. As variações das frações alfa e betaglobulinas são pouco expressivas. A IgG materna, absorvida do colostro, está em concentração elevada no final do primeiro dia de vida e se reduz gradativamente, com o avançar da idade, até atingir os valores

mínimos aos 60 dias nos bezerros da raça Nelore [4,32]. A redução está relacionada à sua degradação, utilização ou distribuição no organismo [13,19] e explica as diminuições da PT, das gamaglobulinas e das globulinas. Ao contrário disso, a concentração da albumina é mais baixa ao nascimento e aumenta com a idade devido à sua síntese hepática [5]. A relação A:G espelha as variações mencionadas, invertendo-se a partir da segunda semana de idade. Finalmente, a GGT materna, concentrada no colostro e absorvida pelo neonato, provoca atividade sérica muito elevada no início da vida do bezerro, servindo como indicador confiável do sucesso da TIP [4,8]. Sendo uma proteína estranha ao organismo, a enzima sofre degradação relativamente rápida e a sua atividade sérica diminui continuamente até atingir valores fisiológicos que são mantidos baixos durante a vida no indivíduo saudável. Nos bezerros estudados, a atividade sérica aos 35 dias de vida ainda não tinha atingido o intervalo de variação fisiológica apontado para a espécie, entre 6 e 17 UI/L [16].

Embora já exista estudo comprovando que bezerros produtos de FIV e de inseminação artificial não apresentam diferenças hematológicas, bioquímicas ou hormonais que possam caracterizar distinções metabólicas [20,25], não foram encontrados trabalhos que tenham comparado a TIP e a variação do proteinograma sérico no primeiro mês de vida nesses animais. O presente estudo traz, portanto, informações inéditas sobre o assunto e tem relevância especial por se tratarem de animais da raça Nelore, na qual a biotécnica de FIV é empregada em escala maior no país. Deve-se destacar, por fim, que os resultados foram obtidos em bezerros que nasceram com peso fisiológico e as inferências se aplicam, logicamente, aos neonatos com essas características. Estudos futuros podem vir a esclarecer que distinções são esperadas no caso dos recém-nascidos com a Síndrome do Bezerro Grande.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que os bezerros da raça Nelore produtos de fecundação *in vitro*, e nascidos com peso convencional, não apresentaram diferenças fisiológicas relacionadas às proteínas séricas quando comparados com bezerros da mesma raça concebidos por método natural. A transferência de imunidade passiva foi bem sucedida e a variação do proteinograma sérico ao longo do primeiro mês de vida obedeceu ao padrão esperado para os indivíduos sadios da espécie.

MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Guabi Rações Ltda. Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Gold Analisa Diagnóstica Ltda. Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>B4B Diagnostic Division. Biomarchesini Produtos Científicos. Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>4</sup>CELM - Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, SP, Brazil.

<sup>5</sup>VRMD - Veterinary Medical Research & Development. Pullman, WA, USA.

**Ethical approval.** The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA/UEL) under the number 03/09.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper

REFERENCES

- 1 **Bailey T.L., Whittier W.D., Murphy J.M., Schurig G.G., Riva A.L., Swecker W.S., Pelzer K.D., Bass R.T., Caudell D. & Eyestone W. 1998.** Serum Immunoglobulin type G concentrations in calves produced by IVF and delivered by elective cesarean section. *Theriogenology*. 50(6): 853-860.
- 2 **Behboodi E., Anderson G.B., Bondurant R.H., Cargill S.L., Kreuzer B.R. Medrano J.F. & Murray J.D. 1995.** Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 44(2): 227-232.
- 3 **Besser T.E., Szenci O. & Gay C.C. 1990.** Decreased colostral immunoglobulin absorption in calves with postnatal respiratory acidosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 196(8): 1239-1243.
- 4 **Costa M.C., Flaiban K.K.M.C., Coneglian M.M., Feitosa F.L.F., Balarin M.R.S. & Lisbôa J.A.N. 2008.** Transferência de imunidade passiva em bezerros das raças Nelore e Limousin e proteinograma sérico nos primeiros quatro meses de vida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(9): 410-416.
- 5 **Eckersall P.D. 2008.** Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th edn. San Diego: Academic Press, pp.117-155.
- 6 **Fagliari J.J., Santana A.E., Lucas F.A., Campos Filho E. & Curi P.R. 1998.** Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalis bubalus*) da raça Murrah. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 50(3): 253-262.
- 7 **Farin P.W., Piedrahita J.A. & Farin C.E. 2006.** Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 65(1): 178-191.
- 8 **Feitosa F.L.F., Camargo D.G., Yanaka R., Mendes L.C.N., Peiró J.R., Bovino F., Lisbôa J.A.N., Perri S.H.V. & Gasparelli E.R.F. 2010.** Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, as 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase para o diagnóstico de FTIP. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(8): 696-704.
- 9 **Feitosa F.L.F., Borges A.S., Benesi F.J., Birgel E.H., Mendes L.C.N. & Peiró J.R. 2003.** Concentração de imunoglobulinas G e M no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa até os 90 dias de idade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 40(Supl 1): 26-31.
- 10 **Gasparelli E.R.F., Camargo D.G., Yanaka R., Mendes L.C.N., Peiró J.R., Bovino F., Perri S.H.V. & Feitosa F.L.F. 2009.** Avaliação física e dos níveis séricos de cortisol de bezerros neonatos da raça Nelore, nascidos de partos normais e auxiliados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(10): 823-828.
- 11 **Gasparelli E.R.F., Camargo D.G., Yanaka R., Perri S.H.V., Nogueira G.P., Lisbôa J.A.N. & Feitosa F.L.F. 2009.** Teores séricos de proteína total, imunoglobulina G e cortisol em bezerros Nelore, ao nascimento e às 24 horas de vida: influência do tipo e da duração dos partos. *Ars Veterinaria*. 25(3): 120-124.
- 12 **Gimenes L.U. 2010.** Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. 122f. São Paulo, SP. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo.
- 13 **Godden, S. 2008.** Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 24(1): 19-39.
- 14 **Gornal A.G., Bardawill C.J. & David M.M. 1949.** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 177(1): 751-766.
- 15 **Jacobsen H., Schmidt M., Holm P., Sangild P.T., Greve T. & Callesen H. 2000.** Ease of calving, blood chemistry, insulin and bovine growth hormone of newborn calves derived from embryos produced *in vitro* in culture systems with serum and co-culture or with PVA. *Theriogenology*. 54(1): 147-158

- 16 Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. Blood analyte reference values in large animals. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th edn. San Diego: Academic Press, pp.882-888.
- 17 Kremers B., Briere R. & Batsakis J.G. 1967. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein electrophoresis. *American Journal of Medical Technology*. 33(1): 28-34.
- 18 Machado Neto R., Packer I.U., Prado G.V.B., Bessi R. & Pauletti P. 2004. Colostral immunoglobulins absorption in Canchim and Nelore calves. *Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 33(6): 1544-1547.
- 19 Mcguirk S. M. & Collins M. 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrums. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 20(3): 593-603.
- 20 Mendonça A.J. 2007. Avaliação hematológica, bioquímica e hemostática de bezerros Brahman provenientes de produção *in vitro* (PIV) e bezerros Brahman de produção *in vivo*. 107f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária). Universidade Estadual de São Paulo.
- 21 Oliveira A.P. 2011. Avaliação clínica, morbi-mortalidade e desenvolvimento de bezerros da raça Brahman produzidos por fertilização *in vitro* e inseminação artificial. 66f. Botucatu, SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual de São Paulo.
- 22 Perino L.J. & Wittum T.E. 1995. Effects of various risk factors on the plasma protein and serum immunoglobulin concentration of calves at postpartum hours 10 and 24. *American Journal Veterinary Research*. 56(9): 1144-1148.
- 23 Pfeiffer N.E., Mcguire T.C., Bendel R.B. & Weikel J.M. 1977. Quantitation of bovine immunoglobulins: Comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. *American Journal of Veterinary Research*. 38(5): 693-698.
- 24 Pontes J.H.F., Nonato Junior I., Sanches B.V., Ereno Junior J.C., Uvo S., Barreiros R.R., Oliveira J.A., Hasler J.F. & Seneda M.M. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*. 71(4): 690-697.
- 25 Rérat M., Zbinden Y., Saner R., Hammon H. & Blum J.W. 2005. *In vitro* embryo production: growth performance, feed efficiency, hematological, metabolic, and endocrine status in calves. *Journal of Dairy Science*. 88(7): 2579-2593.
- 26 Rocha T.G., Franciosi C., Nociti R.P., Nogueira C.A.S. & Flagliari J.J. 2010. Hemograma e proteínas do soro sanguíneo de bezerros Canchim-Nelore e da raça Holandesa nos primeiros 30 dias de vida. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(5): 1250-1254.
- 27 Rocha T.G., Nociti R.P., Sampaio A.M. & Flagliari J.J. 2012. Passive immunity transfer and serum constituents of crossbred calves. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(6): 515-522.
- 28 Rodrigues C.A., Santos P.S.P., Perri S.H.V., Teodoro P.H.M., Anhesini C., Araújo M.A. & Viana Filho M.N. 2010. Correlação entre os métodos de concepção, ocorrência e formas de tratamento das onfalopatias em bovinos: estudo retrospectivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(8): 618-622.
- 29 Sturion T.T., Sturion M.A.T., Sturion D.J. & Lisboa J.A.N. 2013. Avaliação ultrassonográfica da involução das estruturas umbilicais extra e intracavitárias em bezerros sadios da raça Nelore concebidos naturalmente e produtos de fertilização *in vitro*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(8): 1021-1032.
- 30 Szasz G. 1969. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clinical Chemistry*. 15(1): 24-36.
- 31 Takahashi M., Goto T., Tsuchiya H., Ueki A. & Kawahata K. 2005. Ultrasonographic monitoring of nuclear transferred fetal weight during the final stage of gestation in Holstein cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 67(8): 807-811.
- 32 Vettorato E.D., Costa M.C., Flaiban K.K.M.C., Vidotto O., Balarin M.R.S. & Lisboa J.A.N. 2012. Variações de proteínas séricas em bezerros das raças nelore e holandesa do nascimento até os seis meses de vida. *Semina: Ciências Agrárias*. 33(2): 3181-3190.
- 33 Young L.E., Sinclair K.D. & Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*. 3(3): 115-163.

