

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**AVALIAÇÃO DE ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS NO CONTROLE DA
DIARREIA EXPERIMENTAL POR *Cryptosporidium parvum* EM BEZERROS**

FILIPPE LUCAS DE MELO MENDONÇA

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2019**

Filipe Lucas de Melo Mendonça

**Avaliação de alcaloides isoquinolínicos no controle da diarreia experimental por
Cryptosporidium parvum em bezerros**

Tese apresentada ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Elias Jorge Facury Filho

Coorientadores: Antônio Último de Carvalho
Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2019**

M539a Mendonça, Filipe Lucas de Melo, 1988
Avaliação de alcaloides isoquinolínicos no controle da diarreia experimental por
Cryptosporidium parvum em bezerros / Filipe Lucas de Melo Mendonça - 2019
108 p.: il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Coorientadores: Antônio Último de Carvalho
Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Tese de Doutorado apresentada na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Bezerros – Criptosporidiose, - Teses. 2 – bovinos - Teses. 3 – enteropatógenos, –
I. Filho, Elias Jorge Facury - II. Carvalho, Antônio Último de – III. Silveira, Júlia Angélica
Gonçalves da - IV – Universidade Federal de Minas Gerais – V Veterinária.

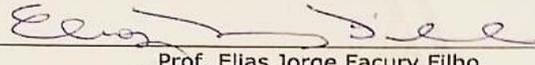
CDD – **636.20896**

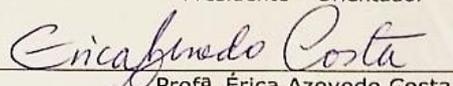
FOLHA DE APROVAÇÃO

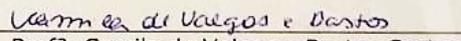
FILIFE LUCAS DE MELO MENDONÇA

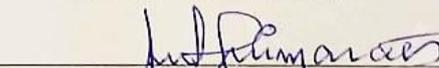
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 29 de Abril de 2019 , pela banca constituída pelos membros:


Prof. Elias Jorge Facury Filho
Presidente - Orientador


Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG


Profª. Camila de Valgas e Bastos Castro
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Antônio Marcos Guimarães
Universidade Federal de Lavras - UFLA


Prof. Gustavo Henrique Ferreira Abreu Moreira
Centro Universitário de Belo Horizonte - UNIBH

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
Aos meus pais e irmãos...
Sem eles nada seria possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu guia em todos os momentos e lugares que estive. Se cheguei até aqui foi por sua graça.

Aos meus pais Jairo e Maria Helena e irmãos Mateus e Carol que mesmo sem saber ao certo o que eu faço me apoiam incondicionalmente em todos os momentos e decisões que eu tomo.

Ao professor Elias Jorge Facury, por me acolher e orientar desde os tempos de iniciação científica até hoje. Muito do que sei devo a ele.

Ao professor Antônio Último de Carvalho, pela coorientação durante todos esses anos, sempre me estimulando com palavras de autoestima e assim cuidando para que a negatividade não me impedisse de crescer.

A professora Júlia Silveira, pela coorientação, conselhos profissionais e amizade de tantos anos

Aos professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial aos docentes Maria Isabel, Érica Azevedo, Camila Bastos e Rodrigo Otávio por me acolherem tão bem no departamento e nas atividades como PCDE. Sou imensamente grato pelas oportunidades. Lembrarei-me sempre com carinho das nossas aulas juntos.

A Júlia Gomes, pelos momentos de trabalho, desespero e aprendizado que vivemos, esses no fim se tornaram algo muito mais valioso: amizade e companheirismo para sempre. Da vet para a vida!

Ao Rafael José da Silva, que um dia apareceu para me ajudar nas coletas e ficou firmemente comigo até o final do experimento e na vida. Valeu por tudo meu grande amigo.

A Bruna Silvestre, pela amizade e apoio durante a fase experimental, me dando força para continuar quando eu achava que não conseguia mais.

A todos os alunos da graduação, estagiários curriculares, pós-graduandos e residentes que contribuíram com seu trabalho na fase experimental (Layanne, João Paulo, Lauranne, Valeska, Adony, Alonso, Rafaela, Michele, Danila, Angélica, Gabriel, Vitor).

A Luana e Markus, estudantes de iniciação científica, obrigado pela disposição em ajudar dedicando muito do seu tempo para a realização desse trabalho. Nada disso seria possível sem vocês, gratidão eterna.

Aos servidores técnicos administrativos da EV/UFMG, meus “coaching” de concursos e grandes amigos: Daiane, Nathanyel, Rômulo, Ana Gabriela e tantos outros que me ajudaram, incentivaram durante esse período e mostraram que eu podia seguir por caminhos que jamais pensei.

Aos amigos (sem citar nomes), de Pará de Minas, da graduação, do mestrado e a todos aqueles que de alguma forma estiveram comigo nessa trajetória pelo apoio e compreensão das minhas ausências em diversos momentos devido as obrigações com o doutorado.

A empresa Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH por todo o apoio técnico pelo fomento oferecido para a realização desse trabalho.

Ao Colegiado Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado

“ Nunca perca de vista o seu ponto de partida. ”

Santa Clara de Assis

SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1. SUSCETIBILIDADE DOS BEZERROS NEONATOS AOS ENTEROPATÓGENOS: MANEJO E IMUNIDADE.....	20
3.1.1. <i>Enteropatógenos relacionados à diarreia de bezerros</i>	20
3.1.2. <i>Fatores de risco relacionados à mãe</i>	21
3.1.3. <i>Fatores ligados à imunidade passiva</i>	23
3.1.4. <i>Fatores intrínsecos ao bezerro</i>	24
3.1.5. <i>Fatores relacionados ao manejo</i>	25
3.2. FISIOPATOGENIA DA CRIPTOSPORIDIOSE EM BEZERROS.....	26
3.2.1. <i>Criptosporidiose bovina</i>	26
3.2.2. <i>Espécies relacionadas com infecções em bovinos</i>	27
3.2.3. <i>Ciclo de vida</i>	28
3.2.4. <i>Patogenicidade e virulência</i>	29
3.2.5. <i>Patogênese da diarreia</i>	31
3.2.6. <i>Associações com outros enteropatógenos</i>	33
3.3. MECANISMOS DE AÇÃO E APLICAÇÃO DOS ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS.....	34
3.3.1. <i>Alcaloides</i>	34
3.3.2. <i>Utilização do extrato vegetal padronizado de <i>Macleaya cordata</i> (Sangrovit®) como aditivo alimentar</i>	35
3.3.3. <i>Mecanismos de ação dos alcaloides isoquinolínicos</i>	36
3.3.4. <i>Apliação do extrato vegetal padronizado de <i>M. cordata</i> nos animais domésticos</i>	40
REFERÊNCIAS.....	49

CAPÍTULO 2 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS E HEMATOLÓGICOS DE BEZERROS NEONATOS COM DIARREIA INDUZIDA POR *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* 62

ABSTRACT.....	62
RESUMO.....	62
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	64
<i>Animais e instalações</i>	64
<i>Delineamento experimental</i>	65
<i>Os 26 bezerros foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 13 animais cada. Durante todas as avaliações, no grupo tratado (SG) os animais receberam 5 g de um extrato vegetal padronizado (Sangrovit® CS) acrescido ao volume de leite de cada uma das duas refeições diárias,</i>	

*a partir da primeira refeição após o colostro. Os animais do grupo controle (CN) não receberam nenhum aditivo a sua dieta. No terceiro dia de vida, todos os bezerros foram desafiados pela inoculação por via oral em dose única de 1×10^6 oocistos de *C. parvum* e nos dias subsequentes os animais foram avaliados diariamente quanto a manifestação de diarreia. Ambos os grupos não receberam qualquer medicação antimicrobiana ou anti-inflamatória durante os dias de diarreia..*

<i>Extrato vegetal padronizado.....</i>	65
<i>Inóculo de desafio.....</i>	65
<i>Amostras para avaliação de enteropatógenos.....</i>	66
<i>Hemogasometria, bioquímica sérica e hemograma</i>	68
<i>Avaliação clínica</i>	69
<i>Análise estatística</i>	70
RESULTADOS.....	70
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO	82
AGRADECIMENTOS.....	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

Lista de tabelas

Tabela 1: Efeitos da criptosporidiose induzida em bezerros recém-nascidos alimentados com dieta suplementada com QBA + PA (grupo SG - n = 13) ou dieta basal (grupo CN - n = 13). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2: Frequência (%) de associações de agentes infecciosos entéricos observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). As frequências de associações não foram significativamente diferentes entre os grupos em nenhum momento. 72

Tabela 3: Média, desvio padrão e intervalos de referência de parâmetros hemogasométricos observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta

suplementada com 10g/dia do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). 75

Tabela 4: Média, desvio padrão e intervalos de referência de parâmetros de bioquímica sérica observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). 77

Tabela 5: Média, desvio padrão e intervalos de referência de parâmetros hematológicos observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). 79

Lista de quadros

Quadro 1: Principais patógenos causadores de diarreia em bezerros (modificado de Millemann, 2009)... 20

Quadro 2: Espécies do gênero *Cryptosporidium* que infectam bovinos e suas características de dimensões de oocistos e faixa etária dos animais acometidos. 28

Quadro 3: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *Cryptosporidium* **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 4: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *Cryptosporidium* 66

Quadro 5: Sequências de oligonucleotídeos para a detecção de coronavírus e rotavírus bovino e tamanho dos amplicons (Asano et al., 2010). 67

Quadro 6: Pontuação dos escores observados no exame físico utilizados para obter o cálculo do escore clínico de desidratação e para a interpretação do grau de desidratação no momento basal e no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia de diarreia. 69

Quadro 7: Interpretação do grau de desidratação de acordo com a pontuação do escore observado no exame físico. 70

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de *Cryptosporidium* (adaptado de Thomson, 2016). 1. Oocistos ingeridos liberam os esporozoítos no intestino; 2. esporozoítos infectam a porção apical dos enterócitos; 3. formação do vacúolo parasitóforo e desenvolvimento do trofozoíto; 4. formação do meronte tipo I; 5. liberação dos merozoítos pelo meronte tipo I; 6. formação do meronte tipo II e liberação dos merozoítos que desenvolvem em gamontes; 7. microgamontes liberam microgametas; 8. macrogamonte é fecundado por microgametas; 9. formação do zigoto após a fecundação; 10. formação dos oocistos de parede fina que rompem ainda no hospedeiro e leva à autoinfecção; 11. oocistos de parede espessa são eliminados nas fezes. 29

Figura 2: Fatores de virulência de *Cryptosporidium* descritos até a data e sua contribuição para o ciclo de vida do parasito (Adaptados da revisão de Bouzid et al., 2013). 30

Figura 3: Local de ação da sanguinarina na via que conduz à ativação de NF-kB por uma variedade de agentes, onde X1 é uma via de ativação de NF-kB na qual a sanguinarina foi capaz de inibir a ativação, enquanto X2 é outra via que não pôde ser inibida pela sanguinarina (Fonte: Chaturvedi et al., 1997). 38

Figura 8: Frequência (%) de enteropatógenos excretados nas fezes de bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). Os valores de frequência com um asterisco sobrescrito (*) são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) no teste exato de Fisher..... 71

Figura 9: Parâmetros clínicos de bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). No ponto com um asterisco sobrescrito (*) houve diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) no teste *Wilcoxon-Mann-Whitney*. 73

Figura 10: Escore clínico de desidratação e grau de desidratação de bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). No ponto com um asterisco sobrescrito (*) houve diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) no teste *Wilcoxon-Mann-Whitney*. 74

Lista de abreviaturas

AnGap	Janela aniônica/ hiato iônico/ Ânion gap
AST	Aspartato aminotransferase
BE	Excesso de base
BID	Do inglês: “bis in die” (duas vezes por dia)
BUN	Nitrogênio ureico do sanguíneo
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
cAMP	Adenosina-monofosfato-cíclico
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CK	Creatina quinase
Cl ⁻	Íon cloreto
CN	Grupo experimental controle
COX 1	Cicloxiogenase 1
COX 2	Cicloxiogenase 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSS	Dextrano sódico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EV-UFMG	Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
g	Gramma
g/dL	Gramma por decilitro
GR	Receptor de glicocorticóides
H ⁺	Íon hidrogênio
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
HSPs	Heat Shock Proteins
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL1-RA	Receptor antagonista de interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF-γ	Interferon gama
IκB	Fator inibidor kappa B
K ⁺	Íon potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
mEq/L	Miliequivalente por litro
mEq/L	Miliequivalente por litro
mg/dL	Miligramma por decilitro
mg/kg	Miligramma por quilograma
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MICs	Concentrações inibitórias mínimas
mL	Mililitros
mM	milimol

mm	Milímetros
mm Hg	Milímetro de mercúrio
mMol/L	Milimol por litro
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NTEC	<i>E. coli</i> necrotoxigênica
OPG	Ovos por grama
OR	Odds Ratio
PA	Alcaloides protopina
PBS	Tampão salina fosfato
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
PPT	Proteína plasmática total
QBAs	Alcaloides quaternários benzo [c] fenantridina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de cadeia polimerase de transcrição reversa
SD	Desvio padrão
SG	Grupo experimental tratado
SN-PCR	Reação de cadeia polimerase <i>Semi-nested</i>
Sp	Espécie
Spp	Espécies
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
TCO ₂	Dióxido de carbono total
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPC	Tempo de preenchimento capilar
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM1	Molécula de adesão vascular 1
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
ΔHCO ₃ ⁻	Variação de Íon bicarbonato
Mm	Micrometro

RESUMO

A infecção por *Cryptosporidium* é uma das causas mais prevalentes de diarreia em bezerros, sendo que a diarreia neonatal corresponde a um dos principais entraves econômicos na bovinocultura leiteira. Como estratégia para minimizar os prejuízos decorrentes dessa enfermidade, o uso de antibióticos adicionados ao alimento vem sendo empregado na criação de bezerros. No entanto, até o momento, nenhuma droga foi capaz de tratar com eficácia a infecção por *Cryptosporidium*. Atualmente, existe uma tendência mundial de identificar substâncias alternativas, naturais e sustentáveis para os medicamentos tradicionais utilizados na produção animal. Isso se deve em razão de exigências internacionais do mercado de produtos de origem animal, que restringem cada vez mais o uso de antimicrobianos em animais de produção. Nesse contexto, os alcaloides isoquinolínicos podem ser uma alternativa de substituição com base em suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes que podem promover a saúde intestinal. Assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar o uso profilático de um extrato vegetal padronizado de *Macleaya cordata* contendo alcaloides isoquinolínicos no controle da criptosporidiose em bezerros neonatos experimentalmente inoculados com oocistos de *C. parvum*. Outro objetivo foi verificar a presença de outros enteropatógenos associados ao *C. parvum* e relacionar os efeitos do aditivo sobre parâmetros clínicos, hemogasométricos, hematológicos e bioquímica sérica dos animais. Utilizou-se 26 bezerros neonatos da raça Holandês distribuídos em dois grupos: SG (dieta suplementada com 10g/dia do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos). O grupo SG apresentou maior ganho de peso médio entre os dias 14 e 21, sem mortalidade e com intensidade e duração de diarreia reduzidas. Em contraste, o grupo CN apresentou distúrbios ácido-base mais graves, taxa de mortalidade de 15,4% além de quadros mais intensos com necessidade de hidratação como terapia suporte. Foram observados outros potenciais enteropatógenos como coronavírus, *Salmonella* spp., *E. coli* (ETEC) e *Giardia* spp. em associações com *Cryptosporidium* em ambos os grupos com frequências semelhantes. Os dois grupos apresentaram desidratação e acidose metabólica compensada, com maior intensidade no grupo CN. No grupo CN foram também observadas reduções significativas das concentrações de colesterol e ferro sérico além de piores parâmetros no leucograma. Estes resultados sugerem que os alcaloides isoquinolínicos adicionados ao leite dos bezerros diminuíram a intensidade e duração dos sinais clínicos e reduziram a necessidade de terapia de suporte, bem como a taxa de mortalidade dos animais. Além disso, a presença do aditivo na dieta foi benéfica para os animais durante os episódios de diarreia com base em parâmetros clínicos e laboratoriais. Assim, essa pode ser uma estratégia alternativa para o minimizar as consequências da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Criptosporidiose, bovinos, enteropatógenos, sangrovit, extrato vegetal padronizado, anti-inflamatório, intestino

ABSTRACT

Cryptosporidium infection is one of the most prevalent causes of diarrhea in calves. On the other hand, diarrhea in neonatal calves corresponds to one of the main economic obstacles in bovine breeding. As a strategy to minimize the damages caused by diarrhea, the use of antibiotics added to food has been used to raise calves. However, to date, no drugs have been able to effectively treat *Cryptosporidium* infection. There is a worldwide trend today to identify alternative, natural and sustainable substances to replace traditional medicines used in animal production. This is due to international requirements in the market for animal products, which increasingly restrict the use of antimicrobials in production animals. In this way, potential substances for use with this purpose are currently targeted for research. In this context, isoquinolinic alkaloids may be an alternative based on their anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant properties that may promote intestinal health. The objective of this study was to evaluate the prophylactic use of a standardized extract of *Macleaya cordata* containing isoquinoline alkaloids that were added to milk in order to control cryptosporidiosis in neonatal calves experimentally inoculated with *C. parvum* oocysts. Another objective was to verify the presence of other enteropathogens associated with *C. parvum* and to relate the effects of the additive on clinical, hemogasometric, hematological and serum biochemical parameters of the animals. Twenty-six Holstein calves were distributed in two groups: SG (diet supplemented with 10g / day of the standardized extract of *M. cordata*) and CN (control diet, without additives). SG calves had a greater average weight gain between days 14 and 21, with no mortality and with reduced intensity and duration of diarrhea. In contrast, calves of the CN group had more severe acid-base disorders, required more hydration support therapy and had a mortality rate of 15.4%. Other potential enteropathogens such as coronavirus, *Salmonella* spp, *E. coli* (ETEC) and *Giardia* spp. in associations with *Cryptosporidium* in both groups with similar frequencies. The calves of both groups presented dehydration and compensated metabolic acidosis with greater intensity in the CN group. In the CN group, significant reductions in cholesterol and serum iron concentrations were observed, as well as worse leukogram parameters. These results suggest that the isoquinolinic alkaloids added to calves' milk decreased the intensity and duration of clinical signs and reduced the need for supportive therapy as well as the mortality rate of the animals. In addition, the presence of the additive in the diet was beneficial for the animals during episodes of diarrhea based also on clinical and laboratory parameters, so this may be an alternative strategy to minimize the consequences of the disease.

KEY WORDS: Cryptosporidiosis, bovines, enteropathogens, sangrovit, standardized plant extract, anti-inflammatory, gut

1. INTRODUÇÃO GERAL

Cryptosporidium é um protozoário entérico que infecta seres humanos e animais em todo o mundo, causando distúrbios gastrintestinais e respiratórios. Pertence ao filo Apicomplexa e até recentemente à classe Coccidia juntamente com outros protozoários de interesse veterinário (Angus, 1990; Ryan et al., 2016). No entanto, recentemente devido as características microscópicas, moleculares, genômicas e bioquímicas (revisado por Ryan et al., 2016), o gênero *Cryptosporidium* foi transferido da classe Coccidia para classe Gregarinomorpha, integrando a nova subclasse Cryptogregarina (Cavalier-Smith, 2014).

Ryan et al. (2015) citaram 27 espécies do gênero *Cryptosporidium* infectando peixes, anfíbios répteis, aves e mamíferos incluindo seres humanos. Algumas espécies são hospedeiro específico, porém acredita-se que a maioria tem a capacidade de infectar diferentes hospedeiros.

A forma infectante de *Cryptosporidium* são os oocistos, que comparativamente são menores que os oocistos dos coccídeos e cada um é preenchido por apenas quatro esporozoítos na ausência de esporocistos (Fayer et al., 1986; Tzipori et al., 2002). O primeiro caso de criptosporidiose em bovinos foi relatado por Panciera et al. (1971), quando observaram atrofia de vilosidades em cortes histológicos do intestino delgado de uma bezerra com diarreia crônica e presença de vários estágios de desenvolvimento do parasito na borda em escova dos enterócitos, com morfologia compatível ao gênero *Cryptosporidium*, previamente descrito por Tyzzer em 1910. A criptosporidiose bovina foi amplamente descrita em diversos países, como Canadá (Sanford et al., 1982), Estados Unidos (Reif et al., 1989), países da Europa (Imre et al., 2011), Etiópia (Abebe et al., 2008) e Brasil (Ederli et al., 2004; Cardoso et al., 2008).

A primeira descrição de *Cryptosporidium* no estado de Minas Gerais - Brasil foi realizada em um levantamento epidemiológico em bezerros com até 60 dias de idade em 23 fazendas de gado leiteiro do estado de Minas Gerais e foram observadas que 74% das fazendas eram positivas para o parasito o que demonstrou sua ampla distribuição em propriedades do estado (Garcia e Lima, 1993).

As espécies envolvidas no quadro de criptosporidiose bovina são *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*. Entre elas, *C. parvum* é a única considerada como agente zoonótico e infecta o intestino delgado causando diarreia em bezerros neonatos (O'Handley et al., 2006; Silverlås et al., 2010).

Bezerros infectados podem apresentar diarreia, geralmente de cor amarelada, com muco e arresponsiva a antibioticoterapia. Outros sinais incluem apatia, anorexia e desidratação, porém alguns animais são assintomáticos (Sanford et al., 1982). Além disso, o parasitismo causa atrofia e fusão de vilosidades, hiperplasia de criptas intestinais e infiltração por células mononucleadas, induzindo a liberação de prostaglandinas. Estes fatores associados desencadeiam diarreia secretória e por má digestão/absorção (Panciera et al., 1971; Tzipori et al., 2002).

A associação do *Cryptosporidium* spp. com outros enteropatógenos é um achado comum e resulta no desenvolvimento e/ou aumento da gravidade dos sinais clínicos (Gulliksen et al., 2009). Sanford et al. (1982) encontraram *Escherichia coli* enterotoxigênica e coronavírus em fezes de bezerros com diarreia pelo protozoário, enquanto Reif et al. (1989) observaram a associação do *Cryptosporidium* spp. com *E. coli*, *Campylobacter* spp., coronavírus e rotavírus bovino. Na

Noruega, a principal associação encontrada por Gulliksen et al. (2009) em 191 fezes de bezerros com diarreia foi o *Cryptosporidium* spp. e o rotavírus bovino. Por outro lado, Carvalho et al. (2014) avaliaram o comportamento longitudinal dos principais agentes envolvidos na diarreia neonatal de bezerros no Brasil e observaram que a associação mais comum foi *Cryptosporidium* spp e bactérias (*Salmonella* e patótipos de *E. coli*).

A criptosporidiose é considerada a segunda maior causa de diarreia e morte em crianças (Ochoa et al., 2004; Striepen, 2013). Devido aos prejuízos à saúde animal e humana, a eficácia de mais de 200 bases de medicamentos já foi avaliada para o tratamento e profilaxia da criptosporidiose nas diversas espécies de hospedeiros. Porém, nenhuma dessas bases apresentou completa eficácia clínica e/ou parasitológica, pois os hospedeiros continuaram a apresentar diarreia e/ou continuaram a excretar oocistos nas fezes durante o curso da infecção (Shahiduzzaman et al., 2012).

Neste contexto produtos fitogênicos têm sido utilizados como aditivo na alimentação de animais de produção como suínos, aves e gado leiteiro. O extrato vegetal padronizado de *Macleaya cordata* é um produto comercial conhecido como Sangrovit® CS. Essa planta contém substâncias ativas denominadas alcaloides isoquinolínicos. Estes incluem uma fração de alcaloides quaternários benzo [c] fenantridina (QBAs) como a sanguinarina, a queleritrina e uma fração de alcaloides de protopina (PA) (Croaker et al., 2016).

As atividades dos alcaloides isoquinolínicos no trato gastrointestinal dos animais tem se destacado, pois induzem a secreção de enzimas intestinais. Além disso, possuem efeito bacteriostático, mucolítico e anti-inflamatório contribuindo para integridade intestinal, além de inibirem enzimas que degradam aminoácidos como a lisina e triptofano, tornando-os mais disponíveis (Chaturvedi et al., 1997; Lindermayer, 2005; Khadem et al., 2014), apresentando também efeitos benéficos na regulação hormonal e química do organismo. Dessa forma, influenciam os mecanismos de ingestão, absorção e disponibilidade de nutrientes para o ganho de peso e os processos imunológicos (www.phytobiotics.com).

Em um futuro próximo acredita-se que a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento animal ratificada pela União Europeia em 2006 (European Union, 2005) se estenderá para o resto do mundo. Desde então, manifestou-se o maior interesse por suplementos alimentares fitogênicos que diminuíssem a população de patógenos gastrointestinais, permitindo redistribuir os recursos de defesa imunológica para o crescimento (Lee et al., 2015; Croaker et al., 2016).

Diante desse contexto que coloca o *C. parvum* spp. entre os principais agentes causadores da diarreia neonatal bovina e do caráter zoonótico da doença associados a inexistência de uma droga com eficácia comprovada para a prevenção e controle da criptosporidiose, este trabalho avaliou a eficiência do extrato padronizado de *M. cordata* na prevenção e controle da diarreia em bezerros neonatos, causada pelo desafio experimental com *C. parvum* e outros agentes etiológicos associados por infecção natural.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia do uso dos alcaloides isoquinolínicos presentes no extrato padronizado de *M. cordata* na quimioprofilaxia e controle da criptosporidiose em bezerros neonatos inoculados experimentalmente.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a intensidade da excreção de oocistos de *C. parvum*;
- Avaliar a interação com outros enteropatógenos;
- Avaliar a duração e da intensidade da diarreia;
- Avaliar as alterações clínicas, ácido-base, hidroeletrólíticas, hematológicas e na bioquímica sérica;
- Avaliar a ingestão leite e do ganho de peso dos animais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Suscetibilidade dos bezerros neonatos aos enteropatógenos: Manejo e imunidade

3.1.1. Enteropatógenos relacionados à diarreia de bezerros

Numerosos agentes infecciosos podem estar associados a fatores ambientais, fisiológicos, nutricionais e de manejo determinando a ocorrência de diarreia em bezerros (Lagoni et al., 2004; Oliveira Filho et al., 2007; Carvalho et al., 2014). Dessa forma, patógenos entéricos de diversas origens podem, individualmente ou, mais frequentemente, em associações de dois ou mais agentes, induzir diarreia em bezerros (Millemann, 2009; Quadro 1).

Dentre esses, ressalta-se como os mais frequentes os patótipos de *E. coli*, *Salmonella* spp., coronavírus, rotavírus, *Cryptosporidium* ssp. e *Eimeria* spp. (Lagoni et al., 2004; Oliveira Filho et al., 2007; Millemann, 2009; Carvalho et al., 2014).

Quadro 1: Principais patógenos causadores de diarreia em bezerros (modificado de Millemann, 2009).

Bactérias	Vírus	Parasitas
<i>E. coli</i> (ETEC, EPEC, EHEC)	Rotavírus	<i>Cryptosporidium</i>
<i>Salmonella</i>	Coronavírus	<i>Giardia</i>
<i>Clostridium</i>	Torovírus (Breda)	<i>Eimeria bovis</i> ou <i>E. zuernii</i>
<i>Campylobacter</i>	BVDV	<i>Toxocara</i>
	Calcivirus (Norovírus)	<i>Strongyloides</i>

Independentemente dos agentes etiológicos envolvidos, as manifestações clínicas da diarreia e suas consequências tendem a ser similares, com destaque para a desidratação, acidose metabólica, atrasos no crescimento e mortalidade (Moon, 1978). Geralmente a taxa de morbidade da diarreia é alta, afetando de 90 a 100% dos bezerros neonatos (Lagoni et al., 2004; Carvalho et al., 2014) sendo considerada a causa mais frequente de morte até o desaleitamento (Lorenz, 2006; Davis e Drackley, 1998).

A idade dos bezerros é um fator de susceptibilidade bastante relacionado à ocorrência das infecções por patógenos específicos. Bezerros menores que três dias de idade são mais acometidos pela diarreia causada por estirpes enterotoxigênicas de *E. coli*; cinco a 15 dias para rotavírus; cinco a 21 dias para coronavírus; cinco a 35 dias para *Cryptosporidium* ssp.; e no intervalo de cinco a 45 dias de vida para *Salmonella* ssp. (Radostits et al., 2007).

São reconhecidos pelo menos cinco patótipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC) (Coura et al., 2014). O patótipo ETEC é o mais relacionado à ocorrência de diarreia em bezerros durante a primeira semana de vida (Foster e Smith 2009; Coura et al., 2014). Acredita-se que esse fato ocorra porque as vilosidades dos enterócitos imaturos expressam mais receptores para fatores de aderência facilitando assim a colonização intestinal (fímbrias de ETEC), o que pode restringir a infecção à primeira semana de vida.

Entretanto, a suscetibilidade a diarreia por ETEC pode voltar a aumentar se houver atrofia das vilosidades intestinais, como acontece nas infecções virais e por *Cryptosporidium* spp., que resulta em migração de células imaturas das criptas intestinais para as vilosidades e maior chance de diarreia por ETEC (Blanchard, 2012). Dessa forma, a infecção por alguns agentes infecciosos pode favorecer a ocorrência de diarreia por outros patógenos. De acordo com Bartels et al. (2010) a eliminação de coronavírus nas fezes de bezerros com idade entre 1 e 21 dias de vida pode aumentar 5,3 vezes as chances de excreção de *E. coli*.

Quanto as diarreias causadas por rotavírus e coronavírus, sabe-se que a susceptibilidade de bezerros neonatos está associada à ausência de anticorpos colostrais específicos no lúmen intestinal, justificando o fato de não serem comuns diarreias por esses agentes nas primeiras semanas após o nascimento (Barrington et al., 2002; Asadi et al., 2015). Além disso, fatores ambientais relacionados à temperatura e umidade podem favorecer os casos de diarreia pelos vírus durante as estações mais frias do ano, uma vez que tais condições beneficiam a sobrevivência e manutenção das partículas virais viáveis por mais tempo no ambiente (Brandt et al., 1982; Radostits et al., 2007, MacLachlan e Dubovi, 2011). Isso é válido principalmente para coronavírus, pois possuem partículas virais envelopadas o que as torna menos resistentes no ambiente, porém é incerto por quanto tempo podem sobreviver (Valarcher e Hägglund, 2011).

3.1.2. Fatores de risco relacionados à mãe

A maior parte do crescimento fetal ocorre durante os últimos dois meses de gestação, o que aumenta a demanda de nutrientes para o feto nesse período (Davis e Drackely, 1998). Dessa forma, fatores que influenciam a fisiologia materna durante a gestação podem afetar o crescimento fetal e a imunidade dos neonatos (Tao et al., 2012). Os bezerros nascidos de vacas subnutridas tendem a apresentar pior desempenho, baixa produtividade e maior susceptibilidade

às doenças, uma vez que a nutrição da vaca no período pré-parto pode influenciar a incidência de distocia, bem como a taxa de crescimento do bezerro após o nascimento (Cho e Yoon, 2013).

Há indícios que a restrição de nutrientes na dieta materna durante a gestação exerce influências causando alterações no trato gastrointestinal dos fetos o que explica pelo menos parcialmente as diferenças observadas no desenvolvimento fetal e no desempenho pós-natal. Os fetos de vacas de corte com restrição de nutrientes durante a gestação inicial (125 dias) e média (245 dias) podem apresentar maiores índices de vascularização e proliferação celular no jejuno. Isso sugere que o intestino fetal se torna mais eficiente, mas ainda não se sabe como essas alterações podem alterar o desempenho e a saúde do bezerro após o nascimento (Meyer et al., 2010).

Além da nutrição materna na gestação outro fator que pode influenciar o desempenho dos bezerros é o tipo de parto. Bezerros nascidos após um parto difícil geralmente têm menor vigor nas primeiras horas após o nascimento em comparação com os bezerros nascidos sem dificuldade ao parto e isso pode acarretar efeitos em longo prazo sobre a saúde e sobrevivência dos bezerros (Barrier et al., 2012). Independentemente do tipo de parto, todos os bezerros tendem a nascer com algum grau de acidose metabólica, no entanto, aqueles oriundos de partos distócicos possuem maiores dificuldades de utilizar mecanismos fisiológicos de compensação para se adaptarem a vida extrauterina (Ferreira, 2012). Assim, bezerros que passam por partos distócicos tendem a ter um mau desempenho, bem como maior suscetibilidade a patógenos ambientais causadores de diarreia. Isso se associa também ao fato desses bezerros demonstrarem maiores dificuldades para ingestão de colostro e apresentarem menores taxas de absorção de imunoglobulinas em comparação com animais nascidos de partos eutócicos (Larson e Tyler, 2005; Cho e Yoon, 2013).

Além desses fatores é importante considerar que o estresse térmico de vacas gestantes durante o período seco pode comprometer o crescimento fetal e a função imune da prole desde o nascimento até o desmame. Segundo Tao et al. (2012) vacas que sofreram estresse térmico tiveram o tempo de gestação médio diminuído em quatro dias em relação a vacas que foram mantidas em condições ambientais de resfriamento. Por outro lado, os bezerros nascidos de vacas que passaram por estresse calórico durante a gestação apresentaram pior eficiência de absorção de anticorpos IgG colostrais e imunidade celular comprometida, além de menor peso ao nascimento e ao desmame.

O estresse térmico em vacas gestantes parece provocar alterações diretamente nos fetos uma vez que, Monteiro et al. (2014) descartaram a influência do estresse calórico sobre a qualidade do colostro quando demonstraram que o colostro de vacas sob estresse térmico no período seco não prejudicou a obtenção de imunidade passiva, nem o crescimento dos bezerros antes do desmame. Porém, os bezerros nascidos de vacas que sofreram estresse térmico e alimentados com um “pool” colostrais de vacas que passaram o período seco em condições termoneutras tiveram a transferência de imunidade passiva comprometida. Contudo, ainda não são claros os mecanismos envolvidos na redução da absorção intestinal de IgG pelo estresse sofrido no útero.

Assim, o estresse calórico ambiental pode ter consequências negativas para o feto no útero, durante a gestação avançada, bem como para a saúde futura dos bezerros. É possível que haja prejuízo do desenvolvimento intestinal do feto, resultando em redução da superfície de absorção pós-natal. Dessa forma, o menor peso ao nascer de bezerros nascidos de vacas em estresse térmico, juntamente com a imunidade passiva comprometida podem ser responsáveis por comprometer o crescimento e pela tendência a piores escores fecais (Laporta et al., 2017).

O desenvolvimento de diarreia em bezerros recém-nascidos pode estar ainda mais profundamente envolvido com fatores maternos do pré-parto. Nesse contexto, a hipocalcemia em vacas no período anterior ao parto também pode estar causando implicações negativas para a saúde dos bezerros, visto que bezerros nascidos de vacas com hipocalcemia apresentaram maior incidência de diarreia (49%) do que aqueles nascidos de vacas que não apresentaram hipocalcemia (33,3%). Os mecanismos dessa associação são desconhecidos, porém uma possível hipótese é que o transtorno metabólico em vacas gestantes possa alterar a permeabilidade do epitélio intestinal de bezerros antes do parto ou levar a produção um colostro com composição diferente que torne os bezerros mais susceptíveis aos patógenos da diarreia (Wilhelm et al., 2017).

3.1.3. Fatores ligados à imunidade passiva

Ao nascimento, os mamíferos são capazes de estabelecer tanto uma resposta imune inata quanto uma resposta imune adaptativa, no entanto suas habilidades imunológicas ainda são muito imaturas. Comparado aos animais adultos, os neonatos elaboram respostas adaptativas mais lentamente, possuem neutrófilos e macrófagos com menor capacidade fagocítica e apresentam menor número de células “natural killer – NK”. Desse modo, a não ser que um auxílio imunológico seja oferecido, microrganismos que representam pouca ameaça para adultos podem facilmente serem letais ao neonato. Tal assistência imunológica pode ser provida por anticorpos e linfócitos maternos para a prole apenas através da ingestão do colostro (Tizard, 2012). O colostro é a primeira secreção produzida pela glândula mamária das vacas no início de cada lactação e é especialmente rico em fatores nutricionais, células de defesa (Linfócitos B e T, neutrófilos e macrófagos) e imunoglobulinas dentre as quais predomina a IgG₁ (Davis e Drackley, 1998). Além disso, o colostro bovino contém inúmeras citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ que podem estar relacionadas ao desenvolvimento do sistema imunológico dos animais jovens (Tizard, 2012).

A concentração de IgG no sangue de bezerros é associada com saúde e sobrevivência. No entanto, baixas concentrações de imunoglobulinas não necessariamente conduzem o bezerro à morte ou à doença, como também altas concentrações podem não garantir a sobrevivência (Davis e Drackley, 1998). Porém, a ingestão do colostro nas primeiras horas após o nascimento e a absorção de anticorpos colostrais no intestino é particularmente importante para proteger o neonato contra doenças septicêmicas e do mesmo modo, a ingestão contínua de IgA e IgG₁ do leite de transição é interessante para maior proteção local contra doenças entéricas (Davis e Drackley, 1998; Tizard, 2012). Nesse sentido, outro importante mecanismo que auxilia na imunidade intestinal é a recirculação das IgGs absorvidas. Isso ocorre porque parte das imunoglobulinas que são absorvidas no intestino dos bezerros através do colostro são secretadas de volta ao intestino e podem favorecer a imunidade contra patógenos intestinais (Besser et al., 1988a; Besser et al., 1988b).

Yang et al. (2015) compararam bezerros neonatos que receberam colostro, leite de transição ou apenas leite nas primeiras horas após o nascimento e demonstraram que a ingestão de colostro pode ajudar os bezerros a estabelecer mecanismos de defesa imunológica e sistema antioxidante imediatamente após o nascimento, o que poderia reduzir os efeitos de micro-organismos nocivos, promover o desenvolvimento intestinal e conseqüentemente diminuir a morbidade e a mortalidade. Nesse trabalho, os bezerros alimentados somente com leite apresentaram os piores resultados com relação a perda de peso e gravidade da diarreia, o que resultou em mortes.

Contudo, Carvalho et al. (2014) observaram quadros diarreia em 100% dos bezerros avaliados mesmo que estes apresentassem bom nível de imunidade passiva segundo os critérios estabelecidos por Godden (2008). Isso demonstrou que a incidência dessa enfermidade não é influenciada apenas por uma boa transferência de imunidade passiva, fatores como presença e quantidade de agentes infecciosos, ambiente desafiador e dieta são altamente relevantes para a incidência de diarreia, pois esses animais foram expostos a um desafio ambiental alto devido à grande contaminação e além disso, foram alimentados com um sucedâneo comercial do leite após a colostragem e assim não receberam a proteção local dos constituintes do leite de transição.

Carvalho et al. (2014) destacaram também nesse estudo a importância da infecção por *Cryptosporidium* spp., que foi o agente infeccioso encontrado em todos os animais nos momentos avaliados. Logo, a observação de que uma boa transferência de imunidade passiva não exerceu nenhum efeito aparente sobre a incidência de diarreia pode estar relacionada à alta frequência desse patógeno atuando durante os episódios da enfermidade. Segundo Harp et al. (1989) o colostro bovino contendo altos títulos de anticorpos específicos contra *C. parvum* parece não ser funcional na proteção de bezerros contra o desafio experimental com oocistos do parasito. Porém, a importância dos leucócitos do colostro não é contemplada nesse estudo e embora ainda não seja totalmente compreendida, essa não deve ser negligenciada, uma vez que a proteção contra *C. parvum* é principalmente mediada por células sendo necessárias mais pesquisas nesse sentido (Meganck et al., 2014).

3.1.4. Fatores intrínsecos ao bezerro

Apesar de ser indiscutível a relevância de uma boa transferência da imunidade passiva, a absorção deficiente dos fatores imunológicos colostrais não é o único determinante da morbidade e mortalidade por diarreia em bezerros. Por isso, nem todos os bezerros que apresentam pouca proteção de anticorpos maternos se tornam doentes (Tyler et al., 1998).

Araújo et al. (2015) propuseram que alguns bezerros podem nascer mais predispostos a diarreia em comparação com outros. Eles compararam bezerros que apresentaram ou não quadros de diarreia durante os primeiros 21 dias de vida. Então, observaram que mesmo apresentando similares taxas de transferência de IgG do colostro para a corrente sanguínea, os bezerros que apresentaram diarreia mostraram maior permeabilidade intestinal durante todo o período avaliado, em comparação com aqueles que não apresentaram diarreia, logo o comprometimento na barreira do epitélio intestinal pode ter ocorrido antes da primeira ingestão de colostro. Isso pode ter permitido que bactérias ambientais do colostro ou alimento alcançassem a lâmina própria e prejudicassem a função da barreira intestinal, levando a diarreia.

De acordo com Angus (1990) algumas características relacionadas a idade tornam os animais jovens geralmente mais susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium* do que animais adultos. Acredita-se que algumas alterações fisiológicas no intestino, independentemente da imunidade adquirida, podem estar envolvidas, na resistência dos adultos a infecção. Nesse contexto, foi observado que uma proteína extrínseca de membrana, homóloga a leucina aminopeptidase, que se encontra presente na mucosa intestinal de bovinos e ratos adultos, porém ausente na mucosa intestinal de bezerros e ratos jovens, pode reduzir a suscetibilidade à infecção por *C. parvum* quando administrada a ratos jovens susceptíveis (Akili et al., 2006).

3.1.5. Fatores relacionados ao manejo

Todo bezerro nasce com potencial genético predeterminado, no entanto esse pode ser afetado permanentemente pelas decisões de manejo implementadas ao longo do seu período de criação. Dessa forma, o manejo contribui fortemente na morbidade e mortalidade de bezerros (Quigley, 2004). Embora nenhum fator isoladamente possa ser considerado como único determinante sobre a incidência de diarreia, os bezerros podem estar mais suscetíveis a apresentarem sinais clínicos devido a manutenção de práticas de manejo inadequadas, bem como precárias condições de higiene alimentar e ambiental (Botteon et al., 2008).

Dentro dessa conjuntura, um estudo na Áustria demonstrou que, independentemente do sistema de produção, fazendas com rebanhos maiores estão mais associadas com a presença de diarreia nos bezerros, o que pode estar relacionado à maior densidade de animais por área, ao manejo de colostro mais complexo e ao menor tempo gasto pelos funcionários com cuidados com os bezerros (Klein-Jöbstl et al., 2014). No Brasil, um levantamento semelhante relatou que diarreia foi menos frequente nas unidades de produção familiar (18,3%), comparativamente aos sistemas pré-empresarial (22,5%) e empresarial (19%). Esses achados possivelmente decorrem de um menor número de animais nas propriedades familiares, assim como da maior atenção aos animais em parte pelo tipo de mão de obra nesses sistemas (Botteon et al., 2008).

Botteon et al. (2008) também observaram que a ocorrência de diarreia foi maior entre os bezerros alimentados artificialmente (no balde) do que entre os animais que estavam em um sistema de aleitamento natural. Nesse caso, as condições de higiene e assepsia dos utensílios utilizados para o fornecimento do colostro e leite eram questionáveis, o que pode não ter garantido o controle da carga microbiana patogênica, elevando à suscetibilidade a diarreia.

Considerando os locais de parição, os casos de diarreia em bezerros foram mais frequentes em fazendas nas quais os partos ocorreram em baias maternidade, o que se justificou nesse estudo, pela falta de higienização do local entre os partos e pelo uso comum dessa área para alocar também animais doentes. Esse manejo pode gerar grande contaminação do ambiente por patógenos e conseqüentemente aumentar a pressão de infecção sobre os bezerros que ali nascem (Klein-Jöbstl et al., 2014). Além disso, segundo Silva Júnior et al. (2011), a permanência das bezerras no piquete maternidade acima de 12h após o nascimento aumentou o risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. (OR=5,79) e *G. duodenalis* (OR=4,13), em relação aos animais que foram removidos deste local nas primeiras 12h de vida.

Em relação ao uso de estações de parição, sabe-se que a concentração de partos em um curto período de tempo faz com que os agentes patogênicos também se concentrem no ambiente, aumentando progressivamente por amplificação nos primeiros bezerros que nascem. Isso aumenta a pressão infecciosa que, associada a outras condições favoráveis, podem levar a prejuízos na saúde dos bezerros (Millemann, 2009). Bezerros expostos a baixas concentrações de patógenos geralmente apresentam sinais clínicos discretos ou se tornam subclínicos, no entanto esses bezerros podem excretar patógenos em grandes quantidades, causando considerável contaminação ambiental (Larson e Tyler, 2005). Conseqüentemente, entre as estratégias de controle para a saúde neonatal é vantajoso impedir o contato de bezerros jovens com os mais velhos, que servem como reservatórios e amplificadores de agentes infecciosos.

Segundo Curtis et al. (2016) o risco de diarreia em bezerros foi maior também para aqueles animais criados em um sistema de instalação coletivo quando comparados a bezerros mantidos em instalações individuais nas três primeiras semanas de vida. Ademais, bezerras mantidas em piquetes coletivos apresentam risco aproximadamente cinco vezes maior de se infectarem por *Cryptosporidium* spp. em comparação aos animais criados em instalações individuais (Silva Júnior et al., 2011). Dessa forma, bezerros neonatos possuem mais chances de permanecer saudáveis quando não expostos a bezerros mais velhos que eliminam altas concentrações de agentes infecciosos patogênicos (Larson e Tyler, 2005).

Contudo, Botteon et al. (2008) em um levantamento no Brasil, relataram que a higiene é mais frequente em propriedades que utilizavam bezerreiros coletivos, pois a aglomeração de animais e o tipo de piso do bezerreiro podem exigir maior frequência na higienização pelo maior acúmulo de matéria orgânica. Porém apenas a higienização mais frequente pode não garantir a maior eficiência do sistema de criação ao reduzir o aporte de agentes infecciosos. Isso porque os efeitos do estresse e/ou competição entre os animais nas instalações coletivas pode comparativamente minimizar os efeitos da higienização ocasional nos sistemas individuais.

A ingestão *ad libitum* de substituto de leite pelos bezerros também foi levantada como um potencial fator de risco para diarreia (Curtis et al., 2016). No entanto, segundo Carvalho et al. (2014) o fornecimento de diferentes volumes de sucedâneo de leite parece não exercer influência sobre a incidência e a etiologia da diarreia em neonatos. Logo, é mais provável que nesse caso tais observações se relacionem ao agrupamento de bezerros aumentando a contaminação ambiental e facilitando a transmissão de agentes infecciosos pelo contato mais próximo (Curtis et al., 2016).

Portanto, embora tenha importância reconhecida, a questão da manutenção das condições higiênicas das instalações, é uma medida frequentemente negligenciada, não sendo comum observar quaisquer procedimentos operacionais padrões para limpeza e desinfecção das instalações de bezerros (Klein-Jöbstl et al., 2014). Bartels et al. (2010) observaram que a limpeza da área do alojamento dos bezerros foi um fator protetor contra infecções por coronavírus e Gulliksen et al. (2009) observaram que a remoção da cama nas baias individuais pelo menos uma vez por semana reduziu o risco de diarreia. O levantamento de Botteon et al. (2008) também mostrou que a diarreia de bezerros foi mais frequente em instalações limpas ocasionalmente do que naquelas que tinham limpeza mais frequente. Desse modo, fica enfatizada a importância de bons procedimentos de higiene nas instalações de bezerros.

3.2. Fisiopatogenia da criptosporidiose em bezerros

3.2.1. Criptosporidiose bovina

A criptosporidiose em bovinos foi relatada pela primeira vez em 1971, quando vários estágios endógenos de desenvolvimento do parasito foram detectados em cortes histológicos do intestino delgado de uma bezerra de oito meses de idade com diarreia crônica. O animal apresentou perda progressiva de peso durante várias semanas, anorexia, fraqueza, ataxia, desidratação e fezes escuras e aquosas. A estrutura da mucosa jejunal apesar de apresentar a espessura normal, possuía vilosidades reduzidas e achatadas. Além disso, nas bordas em escova dos enterócitos havia numerosos organismos, com estruturas diversas, com morfologia compatível ao gênero

Cryptosporidium descrito por Tyzzer em 1910, quando foi relatada a infecção por *C. muris* no rato comum (Panciera et al., 1971).

Porém, a influência da infecção pelo protozoário para a saúde do animal como patógeno primário até então era incerta. Posteriormente, infecções naturais por *Cryptosporidium* foram diagnosticadas em bezerros neonatos com diarreia, nos quais a presença de outros enteropatógenos, comumente associados ao quadro clínico, não foi detectada (Morin et al., 1976; Pohlez et al., 1978). Então na década de 80, a indução experimental da criptosporidiose em bezerros criados livres de patógenos específicos, comprovou a associação do protozoário com o desenvolvimento de enterite e diarreia em animais infectados com oocistos provenientes de um inóculo livre de outros microrganismos (Tzipori et al., 1983; Heine et al., 1984). Dessa forma, animais monoinfectados com *Cryptosporidium* eliminaram oocistos em suas fezes e desenvolveram sinais de anorexia, emagrecimento progressivo, desidratação, depressão, fraqueza e diarreia (Heine et al., 1984; Vargas Jr et al., 2014). A diarreia é arresponsiva à antibioticoterapia, geralmente apresenta coloração amarelada com muco (Sanford e Josephson, 1982; Vargas Jr. et al., 2014).

Na necropsia, os bezerros infectados podem apresentar macroscopicamente os vasos sanguíneos intestinais e mesentéricos congestionados, distensão intestinal, com presença de gás e conteúdo esverdeado, além de aumento de tamanho dos linfonodos mesentéricos e dilatação dos vasos linfáticos (Vargas Jr et al., 2014). A mucosa intestinal pode se apresentar edematosa, hiperêmica, com hemorragias petequiais e em alguns locais podem se observar lesões erosivas (Kalkanov et al., 2015).

De modo geral, na microscopia pode-se encontrar estádios de desenvolvimento do parasito em associação com células epiteliais em toda a extensão do intestino (Heine et al., 1984), porém a infecção ocorre principalmente nas partes mais distais do intestino delgado levando a maiores alterações na mucosa intestinal, particularmente na região do íleo (Tzipori et al., 1983). São observadas atrofia de vilosidades bem como degeneração e desorganização do epitélio dessas, além de hiperplasia das células das criptas (Heine et al., 1984) e variados graus de fusão de vilos, com infiltração de numerosos macrófagos e neutrófilos. As lesões se estendem a lâmina própria com congestão de vasos sanguíneos das áreas atingidas que podem conter grande quantidade de infiltrados mononucleares com linfócitos, plasmócitos, moderada quantidade de eosinófilos e neutrófilos (Tzipori et al., 1983; Vargas Jr et al., 2014).

3.2.2. Espécies relacionadas com infecções em bovinos

Atualmente sabe-se que no mínimo quatro espécies do gênero *Cryptosporidium* estão envolvidas nas infecções de bovinos: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* (quadro 2). A semelhança morfológica entre os oocistos do gênero que infectam bovinos foi uma das maiores limitações de muitos estudos previamente realizados sobre a associação da diarreia causada por *Cryptosporidium* em bezerros, pois todos os oocistos de aproximadamente 5 µm de diâmetro, até recentemente, eram reconhecidos como *C. parvum* (Silverlås et al., 2010).

Quadro 2: Espécies do gênero *Cryptosporidium* que infectam bovinos e suas características de dimensões de oocistos e faixa etária dos animais acometidos.

Espécie	Dimensões do oocisto	Faixa etária de excreção
<i>C. andersoni</i>	7,4 X 5,5 µm	Bovinos jovens e adultos
<i>C. bovis</i>	4,89 x 4,63 µm	Bezerros em idade de pós-desaleitamento
<i>C. ryanae</i>	3,73 x 3,16 µm	Bezerros em idade de pós-desaleitamento
<i>C. parvum</i>	5,0 x 4,1 µm	Bezerros com menos de 21 dias de idade

Cryptosporidium andersoni possui oocistos maiores (7,4 x 5,5 µm) e ovalados e foi previamente referido como *C. muris-like* (Anderson, 1987). Infecta o lúmen de glândulas abomasais de bovinos jovens e adultos sem prejuízos evidentes na vida produtiva e saúde dos animais (Anderson, 1987; Lindsay et al., 2000).

Já *C. bovis* infecta bezerros na faixa etária entre dois e onze meses na fase de pós-desmame. Geralmente estes não apresentam qualquer sinal de doença. *Cryptosporidium bovis* apresenta oocistos menores, (4,89 x 4,63 µm) que os de *C. andersoni*, mas apresentam dimensões semelhantes em relação aos de *C. parvum* e são morfológicamente indistinguíveis. No entanto, análises filogenéticas confirmam a distinção genética entre as duas espécies havendo inclusive ausência de imunidade cruzada (Fayer et al., 2005).

Cryptosporidium ryanae possui os menores oocistos relatados no gênero infectando mamíferos (3,73 x 3,16 µm). Morfológicamente são similares aos oocistos de *C. parvum* e *C. bovis*. Sua infecção é mais frequentemente relatada nos bezerros em idade de pós-desaleitamento sem manifestar quaisquer sinais de doença (Fayer et al., 2008). Com relação a *C. parvum*, esse protozoário é encontrado parasitando principalmente o intestino delgado de bezerros com menos de 21 dias de idade e pode causar diarreia aquosa e profusa (Upton e Current, 1985). Corresponde a 85% das infecções por *Cryptosporidium* em bezerros na fase de pré-desmama, mas apenas 1% das infecções em bezerros pós-desmame (Santín et al., 2004). Além disso, *C. parvum* constitui a única espécie/genótipo zoonótica, encontrada em bovinos.

3.2.3. Ciclo de vida

Em surtos de diarreia quando *C. parvum* é o patógeno dominante a manifestação da doença depende de vários fatores tais como, a patogenicidade do isolado, a susceptibilidade do hospedeiro, a idade a primeira infecção e o nível de contaminação ambiental, que determina a ingestão de oocistos infectantes (Angus, 1990). Os oocistos esporulados (forma infectante) são excretados do corpo de um hospedeiro infectado através das fezes (Ryan e Hijjawi, 2015). No pico da diarreia podem ser excretados oocistos na ordem de 10^6 a 10^7 por grama de fezes (Angus, 1990).

Os animais sadios se infectam através da ingestão de oocistos presentes no ambiente ou contaminantes de água e alimentos (Tzipori e Ward, 2002). Acredita-se que a maioria dos neonatos adquiram a infecção logo após o nascimento, principalmente devido ao grande número de oocistos eliminados pelas vacas no período periparto (Faubert e Litvinsky, 2000).

Cryptosporidium tem um ciclo de vida monoxeno, passando por vários estágios de desenvolvimento e envolvendo ciclos sexuais e assexuais (Ryan e Hijjawi, 2015) que se

completam em bezerros por volta de dois a sete dias (Fayer et al., 1986; Tzipori e Ward, 2002) (Figura 1).

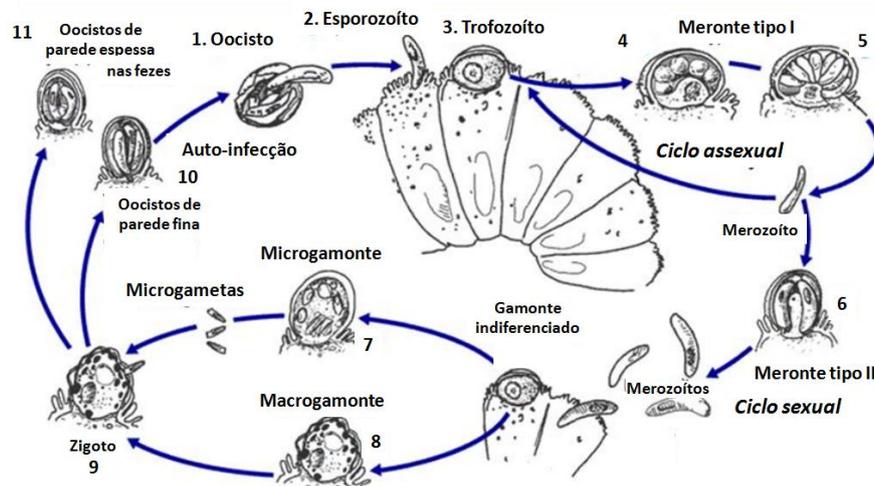


Figura 1: Ciclo de vida de *Cryptosporidium* (adaptado de Thomson, 2016). 1. Oocistos ingeridos liberam os esporozoítos no intestino; 2. esporozoítos infectam a porção apical dos enterócitos; 3. formação do vacúolo parasitóforo e desenvolvimento do trofozoíto; 4. formação do meronte tipo I; 5. liberação do merozoítos pelo meronte tipo I; 6. formação do meronte tipo II e liberação dos merozoítos que desenvolvem em gamontes; 7. microgamontes liberam microgametas; 8. macrogamonte é fecundado por microgametas; 9. formação do zigoto após a fecundação; 10. formação dos oocistos de parede fina que rompem ainda no hospedeiro e leva à autoinfecção; 11. oocistos de parede espessa são eliminados nas fezes.

Uma vez ingeridos, os oocistos liberam esporozoítos no intestino, onde as infecções são predominantemente localizadas no jejuno e íleo (1) (Ryan, e Hijjawi, 2015). Os esporozoítos são liberados e infectam a porção apical dos enterócitos (2) (Tzipori e Ward, 2002). Após a invasão celular pelo esporozoíto ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo ao redor do parasito e o desenvolvimento intracelular do estágio de trofozoíto (3). Esse parasito apresenta uma localização intracelular peculiar, pois se mantém dentro da membrana plasmática da célula hospedeira, porém fora do citoplasma (Leitch e He, 2012). Os trofozoítos sofrem proliferação assexuada para produzir dois tipos diferentes de merontes (4). Merozoítos liberados de merontes do tipo I (5) entram em outras células epiteliais intestinais e desenvolvem-se em merontes do tipo II (6) ou completam outro ciclo de merontes do tipo I. Os merozoítos provenientes dos merontes tipo II, multiplicam-se para produzir microgamontes (7) e macrogamontes (8). Os microgametas fertilizam os macrogametas produzindo zigotos (9), que amadurecem em oocistos (Ryan, e Hijjawi, 2015). Através de uma meiose forma-se então quatro esporozoítos em cada oocisto. O produto final do ciclo é a produção de oocistos totalmente esporulados e infectantes, sendo 20% deles de parede fina (10), os quais existem dentro do mesmo hospedeiro resultando na autoinfecção. Os demais oocistos produzidos (80%) possuem parede espessa (11) e são excretados no ambiente com as fezes (Leitch e He, 2012).

3.2.4. Patogenicidade e virulência

Como fatores de virulência de *Cryptosporidium* devem ser considerados os componentes que permitem que o parasito inicie e mantenha a doença no hospedeiro, podendo afetar o hospedeiro

em qualquer momento durante o seu ciclo de vida (Fayer et al., 2009). A identificação desses fatores de virulência de *Cryptosporidium* é um trabalho complexo devido as dificuldades reconhecidas de manutenção do parasito em cultura *in vitro* bem como a sua manipulação genética (Bouزيد et al., 2013).

Dessa forma, os supostos fatores de virulência para *Cryptosporidium* consistem em alguns genes envolvidos em processos tais como excitação, motilidade por deslizamento, adesão a células hospedeiras, invasão, manutenção intracelular e danos às células hospedeiras (Fayer et al., 2009; Bouزيد et al., 2013). A identificação das moléculas que participam dessas etapas do processo de infecção pelo *Cryptosporidium* é citada na figura 2.

As proteases podem ter funções importantes no ciclo de vida de um parasito. A identificação de proteases funcionais em esporozoítos durante a excitação e o impedimento da infecção na presença de inibidores de protease sugeriu que as proteases como a protease cisteína, a protease serina e a aminopeptidase são importantes nos estágios iniciais da infecção por *Cryptosporidium* como no processo de excitação (Okhuysen e Chappell, 2002; Bouزيد et al., 2013).

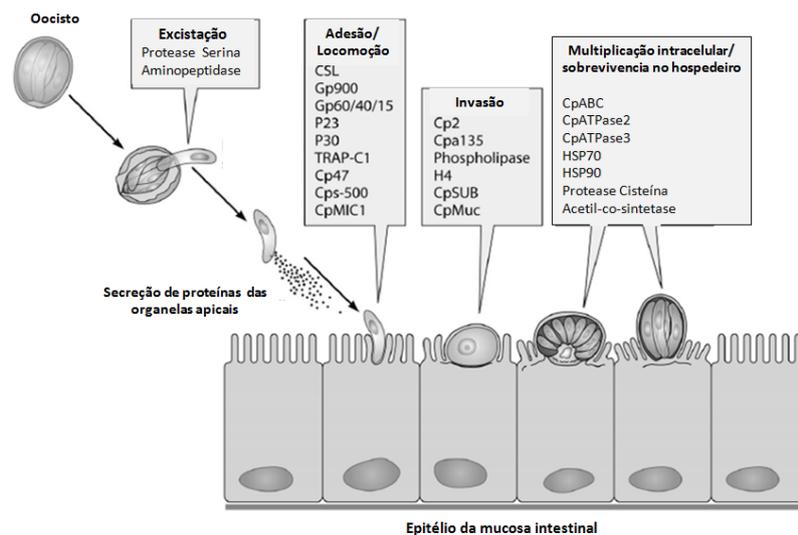


Figura 2: Fatores de virulência de *Cryptosporidium* descritos até a data e sua contribuição para o ciclo de vida do parasito (Adaptados da revisão de Bouزيد et al., 2013).

As interações iniciais hospedeiro-parasito são processos complexos que envolvem múltiplas moléculas de ligação do parasito aos receptores do hospedeiro. Essas interações foram melhor estudadas em outros apicomplexos como *Toxoplasma*, *Plasmodium* e *Eimeria*. Os estágios invasivos de apicomplexos possuem organelas secretoras especializadas (roptrias, micronemas e grânulos densos) coletivamente conhecidos como complexo apical. Durante as interações iniciais hospedeiro-parasito, estas organelas secretam e exocitam proteínas, que facilitam a aderência, a invasão e a formação de vacúolos parasitóforos (Tzipori e Ward, 2002).

Um passo inicial crítico no estabelecimento da infecção é a ligação do parasito às células hospedeiras. Duas classes de proteínas, nomeadas glicoproteínas semelhantes a mucina e proteínas adesivas relacionadas com a trombospondina, foram caracterizadas como mediadoras de adesão (Bouzig et al., 2013). Porém a contribuição relativa de cada molécula para a etapa de adesão permanece indeterminada. É provável que o uso de um grande número de moléculas adesivas, aparentemente redundantes, maximize a capacidade do parasito se ligar em vários potenciais hospedeiros de diferentes espécies. Por outro lado, também é possível que diferenças quantitativas ou qualitativas nessas glicoproteínas possam conferir seletividade para adesão a um determinado hospedeiro (Okhuysen e Chappell, 2002).

Várias moléculas relacionadas ao parasito podem causar danos diretos nos tecidos, como fosfolipases, proteases e hemolisinas, no entanto os mecanismos que causam danos celulares durante a infecção pelo *Cryptosporidium* permanecem desconhecidos (Okhuysen e Chappell, 2002).

Foi observado que *C. parvum* pode expressar a hemolisina H4 que é semelhante a sequência da hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica O157: H7 (Steele et al., 1995). A função dessa hemolisina H4 é desconhecida, mas sua capacidade de romper membranas celulares sugere uma função na invasão celular e/ou a ruptura das membranas vacuolares para a evasão dos merozoítos dos vacúolos parasitóforos (Okhuysen e Chappell, 2002).

Outras proteínas interessantes para o *Cryptosporidium* são as CpABC (*C. parvum* ATP binding cassette) e as HSPs (*Heat Shock Proteins*). A CpABC se localiza na proximidade da organela de alimentação do vacúolo parasitóforo e pode estar associada à obtenção dos requisitos nutricionais para o parasito. Por outro lado, as HSPs são proteínas que funcionam como chaperonas intracelulares para outras proteínas e desempenham um papel importante nas interações entre proteínas, facilitando o transporte, o dobramento, a montagem, a biossíntese e secreção de proteínas recém-formadas (Okhuysen e Chappell, 2002).

3.2.5. Patogênese da diarreia

A diarreia é o sinal clínico que se sobressai na criptosporidiose em mamíferos, mas o mecanismo específico pelo qual *C. parvum* induz diarreia não está totalmente elucidado (Okhuysen e Chappell, 2002). A fisiopatologia da diarreia associada a esse parasito é complexa e parece ser primariamente uma consequência da intensa atrofia de vilosidades, que diminui absorção intestinal e da alteração no transporte de eletrólitos, que ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios (Gookin et al., 2002). Dessa forma, associação entre absorção prejudicada e o aumento da secreção pode contribuir para o trânsito intestinal acelerado na criptosporidiose (Certad et al., 2017).

A atrofia das vilosidades observada na criptosporidiose é causada pela perda de enterócitos, com consequente retração da vilosidade para manter uma barreira epitelial (Foster e Smith, 2009). Como a infecção pelo *Cryptosporidium* induz grave atrofia (Heine et al., 1984), parte da perda de fluidos na infecção é considerada uma consequência direta da atrofia vilosa associada à má absorção de eletrólitos e nutrientes, uma vez que, os processos de absorção são realizados apenas pelos enterócitos maduros do topo das vilosidades (Gookin et al., 2002).

Nos casos de criptosporidiose a hiperplasia das criptas intestinais ocorre em função da substituição das células epiteliais perdidas na vilosidade, no entanto, em infecções mais graves, pode ocorrer o rompimento da barreira epitelial (Foster e Smith, 2009). Supõe-se também que outros fatores, como o aumento da permeabilidade da mucosa, possam contribuir para a absorção ineficaz de eletrólitos e nutrientes (Gookin et al., 2002). Além disso, acredita-se que várias moléculas como fosfolipases, proteases e hemolisinas podem causar danos celulares, aumentar a secreção de fluidos das criptas e conduzir a diarreia por secreção ativa e má absorção (Certad et al., 2017).

Apesar de ser bem reconhecida como uma consequência da infecção por *C. parvum*, o mecanismo da perda celular ainda não é bem esclarecido. Existem duas explicações potenciais para a perda das células epiteliais nessas infecções. O primeiro é um efeito citotóxico direto do organismo no epitélio intestinal, mas essa teoria não é bem aceita na literatura. O segundo e mais provável mecanismo para a perda celular é a apoptose (Foster e Smith, 2009).

Embora a apoptose possa levar à morte do enterócito infectado, há evidências de que o *Cryptosporidium* pode controlar a tentativa do hospedeiro de erradicar a infecção (Gookin et al., 2002). Os resultados de McCole et al. (2000) trabalhando com infecções por *C. parvum* em cultivos *in vitro* de células epiteliais de intestino humano sugerem que o parasito desenvolveu estratégias para limitar a apoptose, a fim de facilitar o seu crescimento e maturação no período inicial após a infecção das células epiteliais. Possivelmente a apoptose induzida por *C. parvum* está relacionada à ativação do NF- κ B (fator nuclear kappa B), pois quando a ativação do fator foi bloqueada, a capacidade de indução de apoptose pelo *C. parvum* foi aumentada e uma fração significativamente maior de células infectadas sofreu apoptose (McCole et al., 2000).

Dessa forma, *C. parvum* previne a indução de altos níveis de apoptose das células epiteliais logo após a infecção, quando o parasito depende da célula hospedeira para crescimento e desenvolvimento (McCole et al., 2000). Porém, aparentemente ativação de NF- κ B ocorre apenas em células diretamente infectadas por *C. parvum* e esta pode ser responsável por uma maior resistência à apoptose. A infecção *in vitro* por *C. parvum* em células de epitélio biliar humano ativou a via NF- κ B/I κ B em células diretamente infectadas, mas não em células adjacentes (não infectadas), o que sugere que sua indução de apoptose pode ser limitada às células circundantes não infectadas (Chen et al., 2001).

Além disso, tal efeito apoptótico nas infecções por *C. parvum* pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento do parasito, isso se baseia em observações que mostraram que na fase de trofozoíto a infecção foi capaz de inibir a apoptose na linhagem celular de adenocarcinoma ileocecal humano (HCT-8), porém nas fases de esporozoíto e merozoíto ocorreu a apoptose das células. Isso sugere que este parasito é capaz de interagir e regular a expressão do gene da célula hospedeira (Mele et al., 2004).

No entanto, a perda de células epiteliais, a atrofia de vilosidades e a má absorção não podem explicar todas as perdas de fluidos observadas em infecções por *C. parvum* (Foster e Smith, 2009). A interação entre *Cryptosporidium* e a superfície apical das células epiteliais do intestino resulta na ativação localizada de cascatas de sinalização (Certad et al., 2017), que culminam na secreção de prostaglandina (PGE₂) pelos próprios enterócitos e leva à ativação de macrófagos na lâmina própria. Por conseguinte, células do mesênquima são induzidas a secretar a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a prostaciclina I₂ (PGI₂). A PGI₂ estimula o sistema nervoso entérico a secretar

acetilcolina (Ach) e polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP). A secreção de acetilcolina, VIP e PGE₂ leva ao aumento na concentração de cálcio intracelular e cAMP, o qual ativa a secreção de ânions (Cl⁻ e HCO₃⁻) e inibe absorção de sódio e cloreto (Argenzio et al., 1996; Gookin et al., 2002; Foster e Smith, 2009).

Além disso, foi demonstrado que a ativação *in vitro* do NF-κB pela infecção por *C. parvum* resultou em secreção de IL-8 que presumivelmente contribuiu para a reação inflamatória causada por este patógeno (Chen et al., 2001). O NF-κB é responsável por regular a ativação de uma ampla variedade de genes que regulam as respostas imunes e inflamatórias em células epiteliais (Glezer et al., 2000). Assim, a inflamação intestinal aguda durante a criptosporidiose parece ser dominada pela secreção de citocinas inflamatórias mediadas por NF-κB. Após a infecção, as células epiteliais liberam citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-8, TNFα, IFNγ) e quimiocinas (C-X-C e fractalkina) no local da infecção, o que, por sua vez, pode contribuir para o aumento da permeabilidade do epitélio, comprometimento da absorção intestinal e aumento da secreção (Di Genova e Tonelli, 2016; Certad et al., 2017).

Na patogênese da infecção por *C. parvum* ocorre um influxo de neutrófilos para lâmina própria, o que aparentemente promove efeitos mais benéficos ao intestino do que patológicos. A depleção de neutrófilos em leitões infectados com *C. parvum* não teve efeitos sobre a gravidade clínica da diarreia. Logo, sugere-se que os mediadores derivados ou estimulados pelos neutrófilos não desempenham um papel significativo na patogênese da diarreia (Zadrozny et al., 2006).

3.2.6. Associações com outros enteropatógenos

Pouco se sabe sobre a interação entre microbiota intestinal e protozoários entéricos, no entanto Ras et al. (2015) observaram que a microbiota intestinal nativa de camundongos experimentalmente imunossuprimidos sofreu perturbações pela infecção por *C. parvum*. Esses autores acreditam que a criptosporidiose afete a microbiota indiretamente através do dano causado à integridade do epitélio intestinal e não pela interação do parasito com a população bacteriana.

Em infecções naturais, o dano intestinal devido à diarreia com excreção de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes é frequentemente atribuído à ação oportunista do parasito agindo em conjunto com outros enteropatógenos primários (Radostits et al. 2007). No entanto, em uma avaliação longitudinal durante o período de patência da diarreia dos principais enteropatógenos de bezerros observou-se que a associação entre eles ocorreu desde o primeiro dia de diarreia (Carvalho et al., 2014). Dessa forma, a coinfeção de *Cryptosporidium* com outros enteropatógenos tem sido um achado comum (Sanford e Josephson, 1982; Reif et al., 1989; Gulliksen et al., 2009; Carvalho et al., 2014; Matsuura et al., 2017) e pode resultar no desenvolvimento e/ou aumento da gravidade dos sinais clínicos (Morin et al., 1980; Gulliksen et al., 2009).

Sanford e Josephson (1982) encontraram *E. coli* enterotoxigênica e coronavírus associados ao protozoário em fezes de bezerros com diarreia, enquanto Reif et al. (1989) observaram a coinfeção de *Cryptosporidium* spp. com *E. coli*, *Campylobacter* spp., coronavírus e rotavírus bovino. Um outro tipo de infecção mista também relatada como causa de mortalidade em bezerros neonatos na ausência de outros agentes infecciosos, ocorreu entre *C. parvum* e o genótipo E de *Giardia intestinalis* (Matsuura et al., 2017). Porém, a associação entre o *Cryptosporidium* spp. e rotavírus bovino em bezerros diarreicos parece ocorrer com mais frequência na maioria das

observações (García et al., 2000; Gulliksen et al., 2009). No entanto há pesquisas que contradizem essa informação. Carvalho et al. (2014) observaram que a combinação mais comum de enteropatógenos foi entre *Cryptosporidium* spp. e bactérias (*Salmonella* spp. e patótipos de *E. coli*), assim como Oliveira Filho et al. (2007) verificaram em seu trabalho com bezerros de corte que a associação mais frequente foi entre *Cryptosporidium* spp. e *E. coli*. Contudo, independentemente de quais os patógenos envolvidos na diarreia, infecções simultâneas podem constituir um dos fatores que determinam um quadro clínico ou subclínico (Reynolds et al., 1986), dado que infecções mistas por patógenos intestinais são mais observadas em bezerros diarreicos que em animais saudáveis (Morin et al., 1980; Reynolds et al., 1986).

3.3. Mecanismos de ação e aplicação dos alcaloides isoquinolínicos

3.3.1. Alcaloides

Os alcaloides constituem um vasto grupo de substâncias no qual são conhecidas mais de 16.000 estruturas moleculares (Memelink et al., 2001). São definidos como moléculas orgânicas sintetizadas principalmente a partir de aminoácidos (ácido aspártico, ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina). De forma geral, esse grupo de substâncias possui caráter alcalino e são insolúveis ou pouco solúveis em água, no entanto seus sais são hidrossolúveis. Em sua constituição química, os alcaloides possuem um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, que define a função química amina na molécula. A presença do grupamento amina confere as propriedades químicas particulares dos alcaloides, além de possibilitar a formação de sais pela combinação com ácidos minerais (Haraguchi e Górnaiak, 2008).

Embora possam ser encontrados em vários seres vivos a ocorrência maior de alcaloides é verificada em plantas superiores, as angiospermas (Henriques et al., 2010). Na composição das plantas, essas moléculas são apenas um exemplo da gama de compostos conhecidos como metabólitos secundários. Anteriormente eram considerados como subprodutos não essenciais do metabolismo primário vegetal, no entanto, atualmente tornou-se mais claro que podem desempenhar funções-chaves para uma planta, como a defesa contra patógenos e herbívoros (Memelink et al., 2001).

O grupo químico dos alcaloides representa para a humanidade grandes impactos na economia, na medicina e nos setores sociais e políticos devido às suas atividades biológicas, sejam elas terapêuticas ou toxicológicas, se tornando alvos de pesquisas (Memelink et al., 2001; Henriques et al., 2010; Croaker et al., 2016). O amplo espectro de ações relatadas para esses metabólitos se deve à variedade estrutural observada, assim como também está relacionado às estruturas químicas básicas que derivam. Isto permitiu distribuir os alcaloides em diversas classes das quais as mais conhecidas são os piperidínicos, piridínicos, pirrolizidínicos, indólicos, indolizidínicos, tropânicos, esteroidais, amínicos e isoquinolínicos (Haraguchi e Górnaiak, 2008).

Os alcaloides isoquinolínicos são derivados dos aminoácidos fenilalanina ou tirosina e apresentam estrutura complexa. Entre as substâncias dessa seção são listadas moléculas importantes como a morfina e a tubocurarina (Haraguchi e Górnaiak, 2008).

3.3.2. Utilização do extrato vegetal padronizado de *Macleaya cordata* (Sangrovit®) como aditivo alimentar

A União Europeia em 2006 ratificou uma proibição condenando a utilização de antibióticos como promotores de crescimento animal, devido ao aumento da resistência dos patógenos aos antibióticos (European Union, 2005). A tendência é que esta proibição afete o resto do mundo e a partir de então, com o objetivo de manter a produção animal sustentável, manifestou-se um maior interesse por suplementos alimentares fitogênicos que diminuíssem os níveis de patógenos gastrointestinais, permitindo redistribuir os recursos de defesa imunológica para o crescimento (Lee et al., 2015; Croaker et al., 2016).

É amplamente aceito que doses subterapêuticas de antimicrobianos são benéficas em sistemas intensivos de produção animal (Bischoff et al., 2005). No entanto, os efeitos esperados dos antimicrobianos em animais podem também estar relacionados com ação anti-inflamatória (Niewold, 2007). Apesar de muitos aditivos comercialmente disponíveis com base em extratos naturais não terem uma definição precisa dos mecanismos de ação para serem fornecidos nos alimentos para animais, vários estudos avaliando a suplementação com o extrato vegetal padronizado de *M. cordata*, conhecido pelo nome comercial Sangrovit® nas dietas indicam benefícios (Viera et al., 2008; Pickler et al., 2013; Khadem et al., 2014; Lee et al., 2015; Bavarsadi et al., 2016; Abudabos et al., 2016).

O Sangrovit® é um composto completamente natural constituído de materiais derivados de plantas (www.phytobiotics.com). Para a sua produção pode-se utilizar ervas ou rizomas das plantas *Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus* ou *Macleaya cordata* (Vienna et al., 2007). Essas plantas são utilizadas há séculos na medicina tradicional e atualmente seus compostos ativos são utilizados na medicina veterinária e humana, em produtos para higiene oral, enxaguantes e gomas de mascar (Vienna et al., 2007; Croaker et al., 2016). Os extratos dessas plantas contêm alcaloides isoquinolínicos em concentrações biologicamente relevantes. Estes incluem uma fração de alcaloides quaternários benzo [c] fenantridina (QBAs) como a sanguinarina, a queleritrina e uma fração de alcaloides de protopina (PA) (Croaker et al., 2016). Tanto a sanguinarina quanto a queleritrina são responsáveis pelos efeitos farmacológicos observados com uso do produto e são os principais componentes ativos do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* que em via de regra constitui uma mistura homogênea padronizada para 1,5% de sanguinarina (Stiborova et al., 2008; Zdarilova et al., 2008; Kantas et al., 2015).

As substâncias ativas contidas no extrato vegetal padronizado de *M. cordata* usadas como aditivos alimentares são protegidas por patentes internacionais detidas pela empresa alemã Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH. O produto é recomendado para a criação de suínos, frangos e gado de corte, no entanto efeitos positivos também foram demonstrados em coelhos, ovelhas, cavalos e peixes (www.phytobiotics.com).

O teor dos alcaloides de uma amostra do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* analisada por HPLC demonstrou que a sua composição de alcaloides em (g/kg) foi: sanguinarina ($13,51 \pm 0,25$), queleritrina ($6,90 \pm 0,09$), α -allocriptopina ($20,26 \pm 1,96$), protopina ($4,30 \pm 0,54$), homoqueleridona ($1,63 \pm 0,13$), diidroanguinarina ($0,25 \pm 0,01$) e traços de oxisanguinarina, oxiqueleritrina e diidroqueleritrina. Picos adicionais foram detectados nas condições experimentais, mas sem identificação (Stiborova et al., 2008; Zdarilova et al., 2008).

A dose do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* recomendada pelos fabricantes para animais de produção é de 20 -100 mg/Kg de alimento. Com o objetivo de avaliar a segurança da administração do extrato como aditivo alimentar aos animais foi realizado um teste em ratos Wistar alimentados com o aditivo em diferentes doses durante 90 dias. As dosagens de 100 ou 7000 mg/Kg de dieta foram bem toleradas nos roedores não havendo evidências de toxicidade sistêmica (Zdarilova et al., 2008).

A segurança do uso de QBAs como aditivos na alimentação de suínos em vários países da União Europeia também gerou preocupação e incentivou a realização de um experimento no qual durante 90 dias suínos foram alimentados com quantidades controladas de alcaloides (sanguinarina e queleritrina). Os animais foram avaliados quanto ao seu estado de saúde, alterações bioquímicas e histológicas e a distribuição dos alcaloides em vários tecidos, particularmente nos músculos. Ao final do período, os parâmetros avaliados se mantiveram dentro do padrão de normalidade e os animais se apresentaram saudáveis comprovando que por via oral, doses diárias de alcaloides de 2 e 100 mg/kg de alimento são seguras (Kosina et al., 2004).

A adição do produto fitogênico ao alimento de suínos na fase de acabamento por 28 dias, na concentração de 100 mg/kg de dieta, não resultou em resíduos detectáveis de sanguinarina ou queleritrina em todos os tecidos e órgãos analisados (fígado, rim, músculo, pele com gordura e tecido adiposo). Portanto, segundo Zhao et al. (2017) não deve haver preocupação com a segurança de exposição da sanguinarina ou queleritrina para as pessoas que consomem os produtos de carne suína e derivados .

A possibilidade de um efeito genotóxico do extrato fitogênico também foi descartada após um ensaio experimental no qual o extrato vegetal padronizado de *M. cordata* foi administrado como uma mistura dietética a ratos em concentrações 100, 7000 ou 14000 mg/kg de alimento durante 90 dias. As doses do extrato utilizadas nesse trabalho foram superiores às recomendações e mesmo assim esses dados *in vivo* mostraram que o produto adicionado no alimento não induziu danos ao DNA de linfócitos ou hepatócitos e nenhuma modificação no DNA hepático (adutos de DNA) foi encontrada (Stiborova et al., 2008).

Além disso, em suínos a administração oral de Sangrovit® demonstrou que os alcaloides são pouco absorvidos, sendo a maior parte excretada sem metabolização nas fezes (Kosina et al., 2004; Tschirner, 2004 citado por Vienna et al., 2007). Logo, os benefícios da adição de Sangrovit® à dieta são principalmente locais no intestino e estão relacionados com a secreção enzimática no intestino, onde produz efeitos bacteriostáticos, mucolíticos e anti-inflamatórios, inibe as enzimas degradadoras dos aminoácidos e aumenta a disponibilidade de lisina e triptofano (Lindermayer, 2005 citado por Vienna et al., 2007).

3.3.3. Mecanismos de ação dos alcaloides isoquinolínicos

3.3.3.1. Atividade antimicrobiana

A descoberta dos alcaloides naturais com ação antibacteriana data da década de 1940, porém muitas dessas pesquisas iniciais não chegaram a determinar as concentrações inibitórias mínimas (MICs). Posteriormente, análises mais detalhadas identificaram vários alcaloides como potentes antibacterianos (MICs $\leq 10 \mu\text{g/mL}$) e entre esses estão alguns alcaloides isoquinolínicos como a queleritrina e a sanguinarina (Cushnie et al., 2014). Porém, acredita-se que os alcaloides benzo-

c-fenantridínicos (QBAs) e protopínicos de *S. canadensis* possuem ação antimicrobiana significativa apenas quando combinados e não individualmente (Croaker et al., 2016). O efeito de tais substâncias pode ser sinérgico, uma vez que, foi observado que o extrato metanólico de rizomas de *S. canadensis* tinha um MIC₅₀ contra *Helicobacter pylori* de 12,5 µg/mL enquanto que os alcaloides individuais foram menos potentes com valores de MIC₅₀ de 50 µg/mL para sanguinarina e 100 µg/mL para queleritrina e protopina (Mahady et al., 2003).

Com relação à sanguinarina, dois mecanismos são propostos para explicar sua atividade antibacteriana, a perturbação da dinâmica da citocinese bacteriana (Beuria et al., 2005) e o comprometimento da membrana citoplasmática microbiana (Obiang-Obounou et al., 2011b).

Quanto à ação sobre a citocinese, sugere-se que os alcaloides agem impedindo a formação do anel Z que é uma estrutura necessária para a divisão da célula procariótica. Para tanto, evidências de suporte incluem demonstrações de que sanguinarina e a berberina podem se ligar a proteína FtsZ que é a primeira proteína a se posicionar para formação do anel Z. Então inibem a atividade de FtsZGTPase, bem como a formação do anel Z, além de induzir o alongamento celular, sem afetar a replicação do DNA, segregação nucleóide ou a estrutura da membrana e sem induzir a resposta SOS para reparo do DNA (Beuria et al., 2005; Cushnie et al., 2014).

Verificou-se também que a sanguinarina pode induzir a liberação de enzimas autolíticas para a parede celular ligadas à membrana que comprometem a membrana citoplasmática bacteriana, resultando numa atividade bactericida (Obiang-Obounou et al., 2011b; Croaker et al., 2016). Além disso, testes *in vitro* utilizando a associação de sanguinarina com antibióticos β-lactâmicos e fluorquinolonas sugeriram que todas as combinações exibiram sinergia, sinergia parcial ou aditividade. Isso demonstrou o potencial da sanguinarina em restaurar a eficácia de antibióticos contra o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Obiang-Obounou et al., 2011a).

3.3.3.2. Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora

A sanguinarina e queleritrina são substâncias biologicamente ativas utilizadas na medicina popular através das plantas para o tratamento de diversas doenças e na odontologia para o combate de placas dentárias e doenças periodontais de carácter inflamatório, mas os mecanismos moleculares da atividade anti-inflamatória desses alcaloides ainda não são conhecidos em detalhes (Dvorak et al., 2006; Pencíková et al., 2012). No entanto, os QBAs, sanguinarina e queleritrina, atuam pelo menos parcialmente através das vias GR (receptor de glicocorticóide) e NF-κB (fator nuclear Kappa B) (Dvorak et al., 2006).

O fator nuclear κB (NF-κB) é um fator de transcrição pleiotrópico e sua ativação pode resultar em ações diversas como a produção de fatores pró-inflamatórios, enzimas de defesa e até regulação da replicação viral. Esse fator consiste em um heterodímero que se mantém normalmente em estado inativo no citoplasma das células devido à ligação com I-κB, uma proteína inibitória. Essa ligação impede a translocação do NF-κB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I-κB desencadeia a translocação do NF-κB para o núcleo e a ligação deste a uma sequência de bases do gene alvo. Essa condição estimula a expressão de vários produtos gênicos tais como citocinas, receptores, proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e de adesão celular e outros envolvidos nos processos de inflamação, choque séptico, aterosclerose, proliferação celular e replicação viral (Glezer et al., 2000).

As ações fisiológicas e farmacológicas dos glicocorticóides são mediadas pelo receptor de glicocorticóides (GR), um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição ligação-dependente. No processo de ativação do receptor de glicocorticóide que se encontra em estado inativo no citoplasma das células, o ligante glicocorticóide liga-se ao receptor e as proteínas chaperonas são dissociadas do complexo e GR transloca-se para o núcleo onde na forma homodimérica GR / GR liga às suas sequências de DNA ativando um processo transcricional para promover o controle da inflamação (Oakley e Cidlowski, 2013).

Um estudo *in vitro* utilizando células HeLa (Human Negroid cervix epitheloid carcinoma cells) demonstrou o efeito da sanguinarina e da queleritrina sobre o GR e o NF-κB, dois importantes agentes com ação anti-inflamatória e pró-inflamatória respectivamente. O tratamento das células HeLa, com ambos os alcaloides, induziu a translocação nuclear da subunidade p65 de NF-κB e de GR, com concomitante diminuição citosólica. No entanto, as análises sobre a atividade de transcrição de GR e NF-κB mostraram que nenhum dos compostos testados tinha a capacidade de desencadear a ação transcricional de GR e/ou NF-κB. Isso evidencia que os tais princípios ativos podem ter numerosos alvos dentro da célula e seu efeito final é o resultado das interações com alvos individuais (Dvorak et al., 2006).

Em destaque, a sanguinarina pode potencialmente ser utilizada para tratar várias doenças de caráter inflamatório, pois demonstrou possuir propriedades anti-inflamatórias quando testada em modelos de inflamação crônica e aguda, *in vivo* e *in vitro* (Niu et al., 2012).

Vários tipos de estímulos inflamatórios e de estresse podem ativar o NF-κB incluindo substâncias como lipopolissacarídeos, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), ceramida, peróxido de hidrogênio, luz ultravioleta, acetato de miristato de forbol e ácido okadaico. Nesse contexto a sanguinarina se mostrou um potente inibidor da ativação de NF-κB. Esse alcaloide foi capaz de bloquear a fosforilação e degradação do I-κB induzida por TNF, IL-1, Ester de forbol e ácido okadaico sem produzir o mesmo efeito em induções promovidas pelo peróxido de hidrogênio e a ceramida, evidenciando a existência de diferentes vias de ativação do NF-κB (Figura 3) (Chaturvedi et al., 1997).

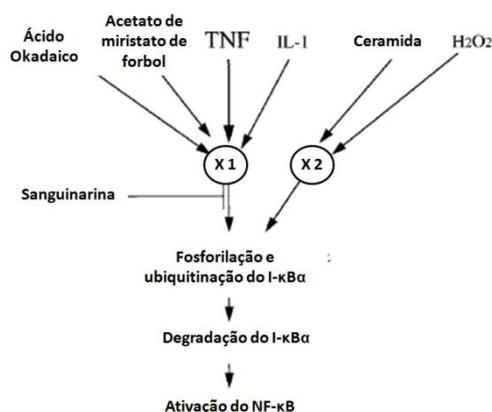


Figura 3: Local de ação da sanguinarina na via que conduz à ativação de NF-κB por uma variedade de agentes, onde X1 é uma via de ativação de NF-κB na qual a sanguinarina foi capaz de inibir a ativação, enquanto X2 é outra via que não pôde ser inibida pela sanguinarina (Fonte: Chaturvedi et al., 1997).

Desse modo, acredita-se que a sanguinarina seja capaz de minimizar a resposta inflamatória ao inibir a produção de alguns mediadores que poderiam amplificar a inflamação. Isso foi observado por Niu et al. (2012) que demonstraram que camundongos sob choque endotoxêmico induzido com lipopolissacarídeos (LPS) apresentaram diminuição da concentração de TNF α no soro quando receberam sanguinarina. Em condições *in vitro*, também mostraram que houve supressão da produção de TNF α e NO (óxido nítrico) por macrófagos peritoneais que eram expostos ao alcaloide. Resultados semelhantes foram observados por Li et al. (2013) no qual mostraram que o uso de sanguinarina reduziu os níveis séricos não apenas de TNF α e NO como também de IL-6 em camundongos com endotoxemia induzida por LPS.

Em outro estudo *in vitro* sobre o efeito da sanguinarina e da queleritrina focado na expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias pela linhagem celular da leucemia monocítica humana (THP-1) ficou demonstrado que as citoquinas afetadas foram principalmente MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1), IL-6 (Interleucina-6) e IL-1RA (Receptor antagonista de IL-1). A queleritrina reduziu o nível de IL-6 enquanto a sanguinarina diminuiu a expressão gênica de MCP-1 e IL-6 e aumentou a expressão de IL-1RA. O aumento de IL-1RA pode favorecer um bloqueio antagonístico do efeito pró-inflamatório de IL-1. Ademais, com relação a esses parâmetros, atentou-se para o fato de que sanguinarina mostrou possuir maior potencial anti-inflamatório em relação a queleritrina, podendo em alguns aspectos ser comparável com a prednisona (Pencíková et al., 2012).

Contudo, os efeitos da queleritrina devem ser considerados tendo em vista que esse alcaloide é um potente inibidor da proteína quinase C (PKC), uma enzima chave para o controle da transdução de sinal, proliferação e diferenciação celular (Herbet et al., 1990). Somando-se a esse mecanismo, a aplicação da queleritrina em camundongos foi capaz de exercer atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas, prevenindo a expressão de prostaglandina E₂ (PGE₂) no exsudato proveniente de uma inflamação induzida. Nesse trabalho também foi avaliada a regulação da expressão e atividade das cicloxigenases (COX-1 e 2) em macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*. A análise demonstrou que o nível de COX-1 não foi afetado, e nas mesmas condições experimentais, a COX-2 apresentou expressão reduzida, sugerindo então que a queleritrina seja um inibidor COX específico (Niu et al., 2011).

A queleritrina também está envolvida na apoptose de polimorfonucleares que é um dos principais processos associados à resolução da inflamação em locais como o intestino, pulmões, articulações e rins. O uso de 10 μ M de cloridrato de queleritrina em culturas de polimorfonucleares humanos foi capaz de induzir um rápido processo de apoptose com a ativação da caspase-3 (mediador de apoptose) através de um mecanismo independente da inibição PKC. No entanto, esse efeito da queleritrina não se limitou apenas às células inflamatórias (Sweeney et al., 2000).

O edema na reação inflamatória pode estar envolvido com mediadores como a histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas que causam vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular. O uso de sanguinarina foi capaz de reduzir a manifestação do edema de orelha induzido com xileno em camundongos, assim, é possível que sanguinarina interfira na função desses mediadores da inflamação (Niu et al., 2012).

A participação ativa de vários tipos celulares em reações inflamatórias e imunes é dependente da expressão de certas moléculas de adesão na superfície das células. O uso do cloreto de

sanguinarina foi capaz de reduzir *in vitro* a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em células de leucemia mielóide de camundongos e da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) em células endoteliais murinas. As duas moléculas são importantes para a patogênese de doenças inflamatórias tais como asma, artrite, nefrite e pneumonite (Tanaka et al., 2001).

O papel dos leucócitos é fundamental para a defesa do hospedeiro com o desencadeamento da resposta inflamatória (Schalm et al., 1975). Baseados nesse contexto, Agarwal et al. (1991) caracterizaram em um estudo *in vitro* a ação da sanguinarina sobre neutrófilos humanos de sangue periférico. O tratamento com sanguinarina não demonstrou citotoxicidade para os polimorfonucleares que mantiveram sua viabilidade em todas as concentrações testadas (0,31 – 200 µM). No entanto, diferentes concentrações de sanguinarina afetaram a funcionalidade dessas células. Em altas concentrações a sanguinarina provocou redução na quimiotaxia, aderência e fagocitose, enquanto o inverso foi observado em baixas concentrações do alcaloide. Tais efeitos inibitórios da resposta inflamatória mediados pela sanguinarina associado à ausência de lise celular com liberação de mediadores inflamatórios podem ter implicações clínicas promissoras.

Sendo assim, dentro da concepção de que os componentes anti-inflamatórios dos alimentos podem ser a solução para o desempenho e a saúde do rebanho, foi demonstrado que a adição de 500 mg/kg do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* na ração foi capaz de modular a intensidade da colite induzida experimentalmente pelo sulfato de dextrano sódico (DSS) em ratos Wistar. Os animais com a dieta suplementada com o extrato apresentaram danos menos graves na mucosa do cólon, representados pela diminuição das alterações histológicas, além de menor expressão da COX-2 e redução da atividade de mieloperoxidase no tecido do cólon, enzimas marcadoras de lesão intestinal aguda (Vrublova et al., 2010).

3.3.4. Aplicação do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* nos animais domésticos

3.3.4.1. Aplicação em aves

A solução para o uso de antibióticos convencionais como promotores de crescimento pode ser a utilização de antimicrobianos naturais produzidos a partir de ervas, o que é geralmente mais aceito pelos países que restringem as importações de produtos oriundos de animais alimentados com antibióticos (Vieira et al, 2008).

Nesse viés, Abudabos et al. (2016) avaliaram o efeito da adição dietética de diferentes fitógenos na dieta de frangos de corte aos 560 dias de vida em comparação ao uso do antibiótico avilamicina nas duas semanas seguintes após infecção experimental com *Salmonella enterica typhimurium*. Entre os compostos testados estava o extrato padronizado de *M. cordata* acrescentado a 5g/kg de ração. A adição do fitobiótico foi tão eficaz quanto o antibiótico em termos de desempenho no crescimento e conversão alimentar. Os autores sugerem que o extrato é uma alternativa em potencial a ser utilizada com sucesso na substituição dos antibióticos convencionais para a manutenção do crescimento e perfil bioquímico dos frangos desafiados com *S. typhimurium*.

Os resultados da utilização do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* diluído na água ingerida por frangos de um a 35 dias de idade confirmam a teoria anti-inflamatória da promoção do crescimento em animais de produção. Comparado ao grupo com dieta controle, os frangos que ingeriram o composto nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/l tiveram aumento sobre o peso corporal nos dias 21 e 35, melhor conversão alimentar cumulativa, enquanto que a taxa de

ingestão não foi influenciada. Além disso, houve redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na mucosa jejunal e diminuição da porcentagem de gordura abdominal o que se relaciona a supressão da resposta inflamatória nesses animais (Khadem et al., 2014).

A adição do extrato vegetal na dieta de frangos de corte também foi uma alternativa favorável como promotor de crescimento (Vieira et al., 2008a; Vieira et al., 2008b; Lee et al., 2015). Resultados positivos foram demonstrados quando o aditivo na dosagem de 50 mg/kg na dieta de frangos de corte causou o aumento no peso corporal aos 21 dias, em 37,5 mg/kg melhorou a taxa de conversão alimentar aos 35 dias e em 12,5 mg/kg aumentou a ingestão de alimento aos sete dias de idade. Adicionalmente, o peso corporal e o consumo de ração não foram afetados quando os frangos foram alimentados com dietas suplementadas em reduções graduais da proteína bruta (Vieira et al., 2008a).

A suplementação com extrato de *M. cordata* a 20 ou 50 mg/kg na dieta de frangos de corte melhorou o desempenho de crescimento sendo observados maiores ganhos de peso corporal entre 21 e 35 dias. Maior consumo foi observado nos animais ingerindo a dieta com 50 mg/kg do aditivo e melhor conversão alimentar foi observada na dieta com 20 mg/kg (Lee et al., 2015). Em outro trabalho, quando o extrato foi utilizado como aditivo na dieta em 50 mg/kg de 1 a 21 dias e 25 mg/kg de 22 a 42 dias, as aves tiveram melhora na conversão alimentar acumulada do período e no peso corporal com 21 dias, mas não posteriormente (Viera et al., 2008b).

A adição dietética do suplemento fitogênico para frangos de corte durante 35 dias na concentração de 20 mg/kg da ração foi também utilizada para caracterizar os efeitos fisiológicos no trato gastrointestinal. O composto de alcaloides dietéticos utilizado na dieta de frangos de corte causou diminuição na concentração de amônia e de ácidos graxos de cadeia curta na digesta cecal indicando que o extrato utilizado inibe os processos de fermentação cecal. Isso indica que o aditivo pode diminuir a atividade proteolítica do ecossistema cecal e/ou ter influenciado positivamente a utilização de proteína na parte superior do trato gastrointestinal (Jankowski et al., 2009).

Contudo, alguns trabalhos contrapõem os benefícios dessa suplementação e relatam que adição dietética do aditivo no nível de 30 mg/kg, não afetou o peso final e a utilização de alimento (Zdunczyk et al., 2010; Juskiewicz et al., 2013). Juskiewicz et al. (2010) questionam essa falta de melhora na ingestão de alimentos e do peso corporal final, pois utilizaram a adição do extrato na dosagem de 15 mg/kg de alimento e apesar da baixa dose, foram observados efeitos positivos sobre o metabolismo da microflora cecal dos frangos de corte. Nesse caso, a suplementação diminuiu atividades enzimáticas potencialmente nocivas de β -glucuronidase e β -glucosidase e ao mesmo tempo elevou a atividade das enzimas glicolíticas bacterianas α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase.

Zdunczyk et al. (2010), trabalhando com a dose dietética de 30 mg/kg observaram apenas efeitos benéficos para o processo de fermentação cecal em frangos de corte (maior concentração de ácido butírico e uma tendência para menor pH da digesta e diminuição da atividade da β -glucuronidase). Por outro lado, Juskiewicz et al. (2013) trabalhando com a adição do extrato à dieta de frangos de corte nessa mesma dose de 30 mg/kg, observou supressão do processo de fermentação cecal com diminuição da atividade de enzimas glicolíticas e produção de ácidos graxos de cadeia curta.

Em algumas condições, apesar de não serem observadas vantagens no desempenho *in vivo* de frangos de corte alimentados com a dieta suplementada, seus efeitos melhoraram o desempenho dos componentes da carcaça. Como foi descrito por Karimi et al. (2014) que relataram que após a utilização da dieta de frangos de corte contendo o aditivo na dosagem de 500 mg/kg houve o aumento do peso das coxas. Além disso, essa dieta proporcionou que esses animais apresentassem melhor resposta imune por possuírem maiores títulos médios de anticorpos séricos quando vacinados contra a doença de Newcastle. Resultados semelhantes também foram observados na suplementação com 500 mg/kg na dieta de galinhas poedeiras, com maior título de anticorpos secundários (Bavarsadi et al., 2016). Assim, acredita-se que o maior estímulo para a síntese de imunoglobulinas séricas nesses casos possa ser um reflexo do aumento na absorção de aminoácidos induzida pelo fitoterápico (Dršata et al., 1996). O incremento do aditivo fitogênico a 500 mg/kg na dieta influenciou também a imunidade celular conduzindo ao aumento de linfócitos e à redução de heterófilos, conseqüentemente diminuindo a relação heterófilo/linfócito que é um bom índice de estresse oxidativo. Isso porque o aumento da contagem de linfócitos pode relacionar-se diretamente com a redução do estresse oxidativo em células imunes (Bavarsadi et al., 2016), que por sua vez, pode ser inibido pela presença da sanguinarina (Psotova et al., 2006).

Além dessas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias como sugerido por Niu et al. (2012), o extrato de *M. cordata* acrescentado a 20 mg/kg na ração de frangos, provocou alterações na microbiota intestinal, aumentando favoravelmente as bactérias ácido-lácticas cecais equilibrando assim a microflora intestinal para um melhor desempenho no crescimento (Lee et al., 2015).

O uso do aditivo como tratamento administrado na água consumida por frangos de corte, sob desafio experimental de 10^5 UFC de *S. Enteritidis*, foi capaz de reduzir o isolamento dessas bactérias presentes no ceco aos sete dias após a inoculação (Pickler et al., 2013). Outro estudo mostrou que a administração nas dosagens de 250 e 500 mg/kg na dieta de galinhas poedeiras resultou na redução da contagem de colônias de *E. coli* e *Salmonella* isoladas do íleo (Bavarsadi et al., 2016). Tais evidências sugerem que o aditivo na dieta poderia também desempenhar um papel na redução de outras doenças entéricas economicamente importantes tais como as causadas por *Clostridium* ou *Eimeria* spp. se administrada preventivamente (Lee et al., 2015), no entanto, mais estudos são necessários.

Corroborando os resultados observados por Jankowski et al. (2009), os frangos inoculados experimentalmente com *S. enteritis* e tratados com sanguinarina apresentaram diminuição na altura das vilosidades em todos os segmentos intestinais e menor profundidade das criptas no jejuno e no íleo. Embora tais achados pareçam indicar um possível prejuízo na absorção de nutrientes e no desempenho produtivo, os tratamentos experimentais não influenciaram o desempenho dos frangos de corte de um a 21 dias. No entanto, sob tal condição de desafio à saúde dos animais, foi observado uma maior quantidade de células caliciformes e células CD3⁺ (marcador associado a linfócitos T) no duodeno e jejuno dos frangos não tratados com o extrato. O aumento dessas células no intestino é relacionado a menor capacidade de absorção porque aumentam a viscosidade intestinal e a taxa de passagem do alimento (Pickler et al., 2013). Possivelmente, assim como foi descrito em suínos, a maioria (98%) da sanguinarina na dieta não deve ser absorvida no trato gastrointestinal e assim excretada nas fezes (Kosina et al., 2004). Dessa forma, a presença desse alcaloide na dieta pode influenciar as funções gastrointestinais, inclusive reduzindo a agressão à mucosa e conseqüentemente minimizando o número de linfócitos recrutados para o local (Pickler et al., 2013).

Apesar de alguns estudos com a utilização do produto na dieta relatarem a ausência de efeitos sobre a morfologia intestinal de frangos de corte (Vieira et al., 2008b; Karimi et al., 2014). Lee et al. (2015) descrevem que a ingestão do composto fitobiótico na dose de 20 ou 50 mg/kg da dieta provocou alterações nos segmentos intestinais das aves. Ocorreu diminuição do peso relativo do jejuno, porém o comprimento relativo de jejuno e íleo aumentaram. Desse modo, é provável que a melhora no desempenho observada nesse estudo seja a consequência de uma modificação na morfologia intestinal otimizando a eficiência de absorção dos nutrientes (Lee et al., 2015).

Os índices de saúde intestinal em galinhas poedeiras também foram melhorados com o incremento do extrato na ração, produzindo uma menor profundidade das criptas, assim como a maior proporção vilosidades/criptas. Verificou-se também maior extensão dos nódulos linfóides da lâmina própria quando foi utilizada a dosagem de 250 mg/kg de dieta. Estes achados reforçam os efeitos positivos do aditivo sobre a imunocompetência local e sistêmica (Bavarsadi et al., 2016).

3.3.4.2. Aplicação em suínos

Em suínos a administração do extrato vegetal padronizado de *M. cordata* é bem tolerada na dose de 100 mg/kg sem causar efeitos adversos observados durante o período de ingestão de 28 dias ou na necropsia dos animais (Zhao et al., 2017). Efeitos benéficos sobre o desempenho de crescimento foram observados em leitões no desmame com o aditivo em 50 mg/kg na ração. Especificamente houve aumento do peso corporal e ganho médio diário, bem como melhor taxa de conversão alimentar (Kantas et al., 2015).

A melhora na retenção de proteínas em animais de produção constitui um dos vários efeitos biológicos da sanguinarina, por reduzir a descarboxilação intestinal de aminoácidos aromáticos e assim potencializando a ingestão de alimentos através de efeitos na via do triptofano-serotonina (Mellor, 2001). Entretanto, quando o aditivo alimentar (30 mg/kg) foi testado em suínos em crescimento não foram observados quaisquer efeitos sobre o balanço de nitrogênio e a ingestão voluntária de ração (Tschirner et al., 2003). Além disso, alimentação suplementada com 100 mg/kg não mostrou vantagens sobre os parâmetros de peso vivo, consumo e ganho de peso médio diário (Zhao et al., 2017).

Segundo Tschirner et al. (2003), os suínos que receberam o aditivo em 30 mg/kg de dieta apresentaram uma maior glicemia antes da alimentação e maiores concentrações plasmáticas de triptofano no período pós-prandial, indicando que o fitobiótico pode garantir uma maior disponibilidade sistêmica deste aminoácido. Em condições *in vitro*, a sanguinarina foi capaz de inibir a enzima L-aminoácido descarboxilase aromática, provavelmente devido à semelhança da sua estrutura química quando comparada com os aminoácidos aromáticos (Dršata et al., 1996). Por essa razão, sugere-se que o modo de ação dos alcaloides sobre o desempenho produtivo dos animais possa estar envolvido na disponibilidade e metabolismo do triptofano e assim melhorar a produtividade por poupar o aminoácido.

Partindo desses princípios, Blank et al. (2010) avaliaram o efeito da suplementação com o extrato na dosagem de 50mg/kg em dietas adequadas ou deficientes em triptofano sobre o desempenho de suínos em crescimento em um ambiente controlado experimentalmente. Não observaram qualquer influência sobre o desempenho de crescimento e ingestão, indicando que o produto *in vivo* não afeta a disponibilidade de triptofano no intestino através da redução da descarboxilação bacteriana ou aumento no apetite por modulação do triptofano-serotonina, mas não excluem que

o composto vegetal possa ter efeitos benéficos por outros mecanismos não abordados nesse estudo, principalmente em granjas devido as condições higiênicas serem mais precárias.

Sendo assim, em um experimento realizado a campo, a ingestão dos alcaloides em suínos na fase de acabamento levou ao aumento na absorção ou recuperação de lisina e treonina em sua dieta. Os animais testados foram suplementados com 50 mg/kg de dieta e com quantidade reduzida de lisina/treonina ou com dieta inalterada (controle). Os níveis plasmáticos de lisina e treonina em suínos testados foram semelhantes ou superiores aos dos suínos controle. O ganho de peso diário médio foi melhor nos suínos em teste e as medidas de carcaça desse grupo também mostraram melhorias significativas na percentagem total de carne magra, área do músculo longissimus e na profundidade do músculo do lombo (Corona et al., 2012).

Alguns parâmetros de bioquímica sérica podem ser afetados pelo uso de aditivos alimentícios fitogênicos. O uso do suplemento na dosagem de 30 g/t da dieta de suínos em crescimento, após o desmame resultou numa diminuição acentuada do nível de colesterol e aumentou o índice fagocítico e a concentração sérica de lisozima. A lisozima é capaz de hidrolisar a parede celular de certas bactérias e por isso a concentração mais elevada de lisozima nos suínos tratados pode ter efeito benéfico principalmente na fase inicial da criação quando a colonização do trato gastrointestinal ainda não está concluída. Desse modo, o aditivo fitogênico pode promover respostas protetoras no hospedeiro (Gudev et al., 2004).

Segundo Kantas et al. (2015) esse aditivo alimentar pode ser também uma ferramenta alternativa para melhorar o estado de saúde e desempenho dos suínos em crescimento por minimizar os efeitos nocivos do estresse que é comum no desaleitamento. Isso foi demonstrado na análise realizada de proteínas de fase aguda em leitões submetidos ao desmame recebendo uma dieta contendo 15 ou 50 mg/kg do suplemento, revelando concentrações significativamente menores de haptoglobina e amilóide A sérica nos animais que ingeriam o composto fitogênico.

Outro momento na cadeia produtiva de suínos que envolve atividades mais estressantes para os animais é o transporte para o matadouro. A suplementação dietética com QBAs + PA presentes no extrato de *M. cordata* também foi eficaz na regulação da resposta ao estresse causado pelo transporte, o que foi demonstrado pela diminuição da concentração de cortisol salivar nos porcos que receberam o aditivo. O mecanismo pelo qual a suplementação melhorou adaptabilidade ao estresse ainda não é compreendido. Além disso, todos esses animais haviam recebido previamente por via oral um coquetel contendo sorovares de *Salmonella*. O impacto negativo do transporte causou aumento na excreção de *Salmonella* nas fezes dos suínos que não receberam o suplemento na dieta, enquanto os animais que receberam o aditivo na dieta diminuíram excreção das bactérias. Consequentemente, a suplementação reduziu a contaminação de carcaças por *Salmonella* nos animais tratados. Dessa forma, esses alcaloides podem também apresentar impacto positivo sobre o bem-estar dos animais e a segurança alimentar para os consumidores da carne suína (Artuso-Ponte et al., 2015).

Ademais, propriedades antimicrobianas são relatadas para alcaloides (QBAs) (Beuria et al., 2005). A análise *in vitro* da concentração inibitória mínima de QBAs extraídos de *M. cordata* contra 36 isolados de *Salmonella* determinou que 25%, (9/36) dos isolados testados de *Salmonella* foram inibidos por 90 µg de QBAs/mL e todos os 36 foram inibidos a 179 µg de QBAs/mL (Robins et al., 2013).

Baseado nesses resultados foi realizada uma avaliação comparativa dos efeitos dos QBAs e da clortetraciclina sobre a excreção de *Salmonella* e integridade do trato gastrointestinal em suínos inoculados com *S. enterica* serovar Typhimurium. Os alcaloides testados foram mais eficazes do que a clortetraciclina para diminuir a eliminação fecal de *Salmonella* aos 40 dias após a inoculação. Contudo, mesmo com a inoculação de *Salmonella*, o ganho de peso diário e a taxa de conversão alimentar se mantiveram dentro dos intervalos esperados para os suínos em crescimento e os porcos que receberam dietas suplementadas com QBAs (1,5 ou 0,75 g / 1.000 kg de alimento) ou clortetraciclina não tiveram maiores ganhos de peso diário ou melhor taxa de conversão alimentar. Além disso, a integridade do trato gastrointestinal mensurada pelo teste de resistência transepitelial foi melhor, embora não significativamente, em suínos alimentados com dietas suplementadas (Robins et al., 2013).

As infecções por *Lawsonia intracellularis* estão entre as principais afecções associadas à diarreia em suínos em crescimento e terminação em todos os países de produção suinícola relevante (Guedes, 2008). A suplementação com o extrato de *M. cordata* em porcos desafiados com *L. intracellularis* foi eficaz para melhorar o desempenho de crescimento e reduzir as lesões patognomônicas causadas por *L. intracellularis*. Assim, as lesões características da infecção na fase aguda da doença (21 dias) foram inibidas, embora o fitobiótico não tenha demonstrado capacidade de diminuir a excreção de *Lawsonia* na PCR quantitativa (Artuso Ponte et al., 2011).

Em leitões em crescimento, o uso aditivo pode também estar relacionado com o aumento da resistência à barreira intestinal, particularmente quando se trata de condições como a diarreia. A introdução do aditivo na dieta na dose de 40 mg/kg aumentou significativamente a expressão das proteínas ZO-1 e claudin-1 que estão presentes nas junções intercelulares do tipo *Tight Junction* na mucosa intestinal, além de melhorar o escore de diarreia nos animais suplementados (Liu et al., 2016).

Quanto a morfologia intestinal, não foram observadas alterações na altura das vilosidades em suínos tratados por gavagem durante cinco dias com 3 mg/dia da sanguinarina contida no extrato fitogênico. Porém, ocorreu redução na profundidade das criptas intestinais o que pode indicar que o tecido é mais eficiente, necessitando de menor requerimento de nutrientes para renovação celular (Silva, 2014). A diminuição da renovação celular indica que as células são mais maduras e conseqüentemente a produção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes se torna melhor (Ibrahim, 2011).

Entre tantas características importantes do extrato vegetal de *M. cordata*, destaca-se o seu efeito anti-inflamatório e propriedades imunomoduladoras. Tais particularidades podem melhorar a imunidade intestinal, reduzindo a inflamação na mucosa do intestino delgado, que geralmente se desenvolve como resultado ao estresse (Liu et al., 2016). Silva (2014) observou maior nível sérico de IgA em suínos tratados com sanguinarina e sugeriram que o efeito positivo da sanguinarina sobre a maior produção de IgA pode favorecer a preservação de estruturas do epitélio intestinal além de diminuir os processos inflamatórios, favorecendo o desempenho dos animais. Liu et al. (2016) também verificaram maior concentração sérica de IgG em suínos alimentados com a dieta suplementada.

3.3.4.3. Aplicação em ruminantes

Devido à demanda crescente por produção de alimentos, a preocupação com o uso de substâncias

promotoras de crescimento em formulações de ração para os bovinos tem aumentado nos últimos anos juntamente com a busca pelo uso de substâncias alternativas (Aguilar-Hernández et al., 2016). Ainda existem poucas informações científicas avaliando o potencial dos alcaloides isoquinolínicos como aditivos dietéticos para ruminantes (Estrada-Angulo et al., 2016). Porém, alguns achados já indicam que a suplementação com QBA + PA presentes no extrato vegetal padronizado de *M. cordata* provoca maior eficiência da microbiota ruminal, diminuindo a degradação de nitrogênio dietético não amoniacal e melhorando a digestão pós-ruminal (Aguilar-Hernández et al., 2016).

Para ruminantes adultos preconiza-se o uso da formulação de Sangrovit-RS[®] que é uma fonte padronizada que contém 3g de alcaloides (QBA + PA) por quilograma de produto. A adição desse composto à ração de novilhos da raça Holandês alimentados com dietas de terminação concentradas não afetou o comportamento alimentar assim como a digestão ruminal da matéria orgânica, da fibra detergente neutro e do amido. No entanto, melhorou a eficiência da utilização de nitrogênio. Este efeito foi observado linearmente na adição de aproximadamente 6, 12 e 18 mg do composto/animal/dia. A suplementação diminuiu a concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen e duodeno o que pode ser atribuído à diminuição da proteólise e desaminação de aminoácidos. Além disso, houve aumento na concentração de acetato no rúmen e simultaneamente diminuiu a concentração rumenal de valerato. A diminuição deste ácido graxo volátil pode estar relacionada às interferências na ação microbiana sobre peptídeos reforçando os achados relacionados a redução da degradação da proteína no rúmen (Aguilar-Hernández et al., 2016).

A inclusão de 0,5g do aditivo em dietas de alta energia para a alimentação de ovelhas em confinamento melhorou a eficiência de ganho de peso em 8,3% mesmo em condições de alto estresse ambiental (alta temperatura e umidade). As alterações nas características da carcaça consistiram apenas na diminuição do fígado e aumento da gordura visceral a qual pode ser consequência do aumento da concentração molar de acetato no rúmen que também foi observado nesse trabalho naqueles animais que ingeriam o aditivo. Ademais, foi observado que o epitélio ruminal dos ovinos alimentados com os alcaloides apresentou escores mais baixos de degeneração celular, paraqueratose e infiltração de neutrófilos. Esses resultados sinalizam que o epitélio ruminal de ovelhas alimentadas com o aditivo mostrou menos inflamação, mesmo sob as condições experimentais específicas de alta densidade energética da dieta que consistiram em um fator de risco aumentado para inflamação no tecido epitelial do rúmen (Estrada-Angulo et al., 2016).

A adição de alcaloides sanguinarina e queleritrina pode modular a fermentação ruminal em condições *in vitro* com pH ruminal fisiológico favorecendo o aumento da degradação da proteína bruta e a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta, propionato e valerato, sugerindo possíveis benefícios *in vivo* para aumentar o fornecimento de energia a partir a gliconeogênese hepática em ruminantes (Mickdam et al., 2016). Isso pode justificar os relatos de Moreno et al. (2015) que descrevem uma tendência de aumento linear do ganho de peso de novilhos em confinamento à medida que se aumenta a quantidade do fitobiótico na dieta. Ademais, a alimentação com o aditivo em dosagens próximas de 3 g/dia demonstrou melhora na eficiência alimentar e na redução da quantidade de gordura perirenal, pélvica e no coração de bovinos de terminação (Barajas et al., 2015a).

A adição de extrato de *M. cordata* na dieta de bovinos em confinamento para engorda ajudou a

reduzir a quantidade de *E. coli* excretada nas fezes, e assim pode reduzir potencialmente a contaminação fecal da água e de alimentos, pois o número de UFC de *E. coli* nas fezes diminuiu linearmente à medida que a quantidade de extrato de *M. cordata* aumentou na dieta (Moreno et al., 2015). Outra consideração favorável diz respeito ao fato dos QBAs + PA também poderem minimizar a excreção de ovos de nematoides em bezerros de corte que receberam o extrato de plantas. Os animais que ingeriram o produto na dosagem de 10g/dia apresentaram após 28 dias de tratamento uma redução na contagem de OPG (ovos por grama de fezes) principalmente com relação aos helmintos dos gêneros *Haemonchus* sp. e *Cooperia* spp. (Barajas et al., 2015b).

Quando utilizado em vacas leiteiras, as concentrações de sanguinarina e queleritrina foram indetectáveis no leite das vacas tratadas com o extrato padronizado de *M. cordata* incluído na mistura total da ração na dosagem de até 10.000 mg/animal/dia. A adição do produto na dieta foi bem tolerada pelas vacas, contudo nesse trabalho o consumo de ração e o ganho de peso corporal não foram influenciados pela ingestão dos alcaloides na dieta, não havendo diferenças na produção e composição do leite dos animais tratados (Wang et al., 2017).

Para bezerros em fase de aleitamento o produto a base de QBA + PA pode ser considerado como uma potencial ferramenta de apoio para um dos períodos mais sensíveis na criação. Neonatos que receberam a dose diária de 2g do Sangrovit-CS[®] adicionado ao leite do 3^o ao 21^o dia de vida apresentaram desempenho produtivo, comportamento de consumo e incidência de diarreia semelhantes a bezerros que recebiam doses profiláticas de halofuginona do 6^o ao 12^o dia de vida. A halofuginona é conhecida por reduzir a excreção de *Cryptosporidium* e assim minimizar o efeito da diarreia em bezerros, logo acredita-se que o estado de saúde dos bezerros poderia ser negativamente afetado caso não recebessem esse medicamento (Wirth et al., 2014). Nesse mesmo contexto, para comprovar a influência dos QBA + PA, Saltijeral et al. (2015) avaliaram bezerros de duas fazendas comerciais que ingeriam 10g de Sangrovit-CS[®]/dia do 3^o ao 23^o dia de idade e verificaram que os alcaloides do extrato vegetal podem aliviar os distúrbios intestinais e minimizar a persistência de diarreia possuindo então uma influência positiva no bem-estar animal e tendência a um maior ganho de peso.

3.3.4.4. Aplicação em outras espécies

Os elevados custos de produção, bem como os preços variáveis dos peixes, obrigaram os produtores e os pesquisadores a procurar meios de tornar a produção de pescado mais eficiente (Peterson e Bosworth 2014). Extratos de ervas têm sido amplamente utilizados na medicina veterinária e humana e atualmente, tem servido como uma estratégia alternativa na alimentação animal para substituir os antibióticos promotores de crescimento na aquicultura (Direkbusarakom, 2011; Imanpoor e Roohi, 2015).

Na aquicultura os relatos do uso dos princípios ativos de *M. cordata* são escassos (Yao et al., 2010). No entanto, é relatado que o extrato vegetal padronizado de *M. cordata* apresentou efeito positivo no desempenho do crescimento da tilápia (*Oreochromis niloticus*) sem afetar a composição da carcaça e o estado de saúde. Foram observadas maiores taxas de ingestão diária média de alimentos em peixes alimentados por 60 dias com dietas contendo de 25 a 100 mg/kg do composto. Consequentemente, a taxa de crescimento específico e o ganho de peso foram maiores nos grupos suplementados. Além disso, nesse estudo o aumento na ingestão não prejudicou a eficiência de utilização dos alimentos, o que permitiu o crescimento mais rápido dos peixes, conduzindo a melhora no tempo de produção (Rawling et al., 2009). Resultados

semelhantes foram observados nos parâmetros produtivos de ganho de peso e de crescimento na espécie *Rutilus rutilus* utilizando o extrato vegetal nas concentrações 0,05 a 0,15% da dieta durante 45 dias (Imanpoor e Roohi, 2015).

Rawling et al. (2009) trabalhando com *Oreochromis niloticus* não observaram efeitos de toxicidade do produto sobre parâmetros hematológicos, imunológicos e de função hepática que permaneceram inalterados nos peixes suplementados, com exceção dos níveis de leucócitos totais que foram elevados. Em contrapartida, Imanpoor e Roohi (2015) verificaram níveis de glicose e colesterol sanguíneos menores e de proteína total sérica foi maior para *Rutilus rutilus* tratados com o aditivo alimentar, o que pode indicar um melhor estado de saúde hepática e menores níveis de estresse para os peixes.

Em outro contexto, a eficácia antiparasitária dos compostos extraídos das folhas de *M. cordata* foi verificada em um ensaio *in vitro* contra o protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, que é um dos parasitos mais patogênicos de peixes de cativeiro. Os testes mostraram que a fração contendo sanguinarina era 100% eficaz contra *I. multifiliis* a uma concentração de 0,7 mgL⁻¹. Posteriormente testes de eficácia antiparasitária *in vivo* foram realizados em peixes da espécie *Ctenopharyngodon idella* e demonstraram que o tratamento com sanguinarina em 0,9 mgL⁻¹ reduziu 96,8% do número de parasitos em comparação com o grupo não tratado durante 48 horas. Adicionalmente, não foi observada mortalidade nos peixes que receberam tratamento, no entanto 40% dos peixes não tratados morreram (Yao et al., 2010).

O benefício da utilização do composto fitogênico como anti-inflamatório ou como alternativa aos antibióticos para o controle da infecção de bactérias patogênicas é promissor. Esse aditivo alimentar foi capaz de reduzir o número total de bactérias no intestino dos camarões de patas brancas (*Litopenaeus vannamei*) quando utilizado nas doses de 100 e 200 mg/kg de alimento, prevenindo também a infecção experimental com 10³ UCF /ml de *Vibrio harveyi*, uma bactéria causadora de mortalidade em massa e grandes prejuízos para a carcinicultura (Rairat et al., 2013).

Em coelhos, a mortalidade entre 50 e 60 dias de idade na fase final de engorda geralmente está relacionada a distúrbios digestivos. O aditivo de *M. cordata* na dieta de coelhos permitiu diminuir a mortalidade, em particular por enterocolite, nos animais alimentados com planos de alimentação restrita ou *ad libitum* suplementados nas dosagens de 40 ou 80 mg/kg. No entanto, não foi observado efeito sobre o peso vivo e o crescimento diário (Teillet et al., 2012).

REFERÊNCIAS

ABEBE, R.; WOSSENE, A.; KUMSA, B. An epidemiological study of *Cryptosporidium* infection in dairy calves on selected dairy farms of central Ethiopia. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 159, n. 2, p. 107-111, 2008.

ABUDABOS, A. M.; ALYEMNI, A. H.; DAFALLA, Y. M.; et al. The effect of phytogenic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 23, p. 24151-24157, 2016.

AGARWAL, S.; REYNOLDS, M. A.; POU, S.; et al. The effect of sanguinarine on human peripheral blood neutrophil viability and functions. *Molecular Oral Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 51-61, 1991.

AGUILAR-HERNÁNDEZ, J. A.; URÍAS-ESTRADA, J. D.; LÓPEZ-SOTO, M. A.; et al. Evaluation of isoquinoline alkaloid supplementation levels on ruminal fermentation, characteristics of digestion, and microbial protein synthesis in steers fed a high-energy diet. *Journal of animal science*, v. 94, n. 1, p. 267-274, 2016.

AKILI, D.; HEIDARI, M.; WELTER, L. M.; et al. Characterization of a factor from bovine intestine that protects against *Cryptosporidium parvum* infection. *Veterinary parasitology*, v. 142, n. 1, p. 168-172, 2006.

ANGUS, K. W. Cryptosporidiosis in ruminants. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 83-103.

ARAUJO, G.; YUNTA, C.; TERRÉ, M.; et al. Intestinal permeability and incidence of diarrhea in newborn calves. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 10, p. 7309-7317, 2015.

ARGENZIO, R. A., ARMSTRONG, M., RHOADS J. M. Role of the enteric nervous system in piglet cryptosporidiosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 279, n. 3, p. 1109-1115, 1996.

ARTUSO PONTE, V.; ABLEY, M.; MOLLA, B. Z. et al. Activity of Sangrovit® against *Lawsonia intracellularis* in grower pigs and its impact on gut physiology and host immunity. In: Proceedings Posters of Safe Pork, 2011. p. 345.

ARTUSO-PONTE, V.; MOELLER, S.; RAJALA-SCHULTZ, P.; et al. Supplementation with quaternary benzo (c) phenanthridine alkaloids decreased salivary cortisol and *Salmonella* shedding in pigs after transportation to the Slaughterhouse. *Foodborne pathogens and disease*, v. 12, n. 11, p. 891-897, 2015.

ASADI, A. H.; BAGHINEZHAD, M.; ASADI, H. Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus and coronavirus: a review. *International Journal of Biosciences (IJB)*, v. 6, n. 2, p. 230-236, 2015.

BARAJAS, R.; CERVANTES, B. J.; ROGGE, I.; et al. Supplementary levels of *Macleaya cordata* plant extract Sangrovit-RS on feedlot performance and carcass traits of finishing

bullocks. In: *Annual Meeting Abstracts - American Dairy Science Association, American Society of Animal Science*, 2015a. p. 122.

BARAJAS, R.; CORONA, M. B.; MURILLO, E. X.; et al. Influence of *Papaveraceae* plant preparation on nematode egg count in feces of receiving bull-calves. In: *Annual Meeting Abstracts - American Dairy Science Association, American Society of Animal Science*, 2015b. p. 23.

BARRIER, A. C.; RUELLE, E.; HASKELL, M. J.; et al. Effect of a difficult calving on the vigour of the calf, the onset of maternal behaviour, and some behavioural indicators of pain in the dam. *Preventive veterinary medicine*, v. 103, n. 4, p. 248-256, 2012.

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

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

BAVARSADI, M.; MAHDAVI, A. H.; ANSARI-MAHYARI, S. et al. Effects of different levels of sanguinarine on antioxidant indices, immunological responses, ileal microbial counts and jejunal morphology of laying hens fed diets with different levels of crude protein. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 2016.

BESSER, T. E.; GAY, C. C.; MCGUIRE, T. C.; et al. Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. *Journal of virology*, v. 62, n. 7, p. 2238-2242, 1988b.

BESSER, T. E.; MCGUIRE, T. C.; GAY, C. C.; et al. Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves. *Journal of virology*, v. 62, n. 7, p. 2234-2237, 1988a.

BEURIA, T. K.; SANTRA, M. K.; PANDA, D. Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, v. 44, n. 50, p. 16584-16593, 2005.

BLANK, R.; MÜLLER-SIEGWARDT, B.; WOLFFRAM, S. Sanguinarine does not influence availability or metabolism of tryptophan in pigs. *Livestock Science*, v. 134, n. 1, p. 24-26, 2010.

BOTTEON, R. D. C. C. M.; BOTTEON, P. D. T. L.; JÚNIOR, J. D. C. B. S.; et al. Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paraíba Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n. 2, p. 153-160, 2008.

BOUZID, M.; HUNTER, P. R.; CHALMERS, R. M. et al. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 1, p. 115-134, 2013.

BRANDT, C. D.; KIM, H. W.; RODRIGUEZ, W. J. et al. Rotavirus gastroenteritis and weather. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 478-482, 1982.

- CARDOSO, J. M. S.; SILVEIRA, F. L.; ARAÚJO, A. J. U. S. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 239-242, 2008.
- CARVALHO, J. G.; CARVALHO, A. U.; HEINEMANN, M. B. et al. Estudo longitudinal da infecção por enteropatógenos em bezerros neonatos, com diarreia, sob diferentes estratégias de aleitamento. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 6, p. 529-536, 2014.
- CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European journal of protistology*, v. 50, n. 5, p. 472-495, 2014.
- CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M. et al. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, p. 1-16, 2017.
- CHATURVEDI, M. M.; KUMAR, A.; DARNAY, B. G.; et al. Sanguinarine (pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 48, p. 30129-30134, 1997.
- CHEN, X. M.; LEVINE, S. A.; SPLINTER, P. L. et al. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor κ B in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology*, v. 120, n. 7, p. 1774-1783, 2001.
- CHO, Y.; YOON, K. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of veterinary science*, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2014.
- CORONA, E. B.; SPIRU, D.; LI, D.; et al. Evaluation of limiting amino acid uptake in finisher pigs dosed orally with sanguinarine alkaloids. *The Pig Journal*, v. 67 p. 39-42, 2012.
- COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.
- CROAKER, A.; KING, G. J.; PYNE, J. H.; et al. *Sanguinaria canadensis*: Traditional Medicine, Phytochemical Composition, Biological Activities and Current Uses. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 9, p. 1414, 2016.
- CURTIS, G. C.; ARGO, C. M.; JONES, D.; et al. Impact of feeding and housing systems on disease incidence in dairy calves. *Veterinary Record*, p. vetrec-2016-103895, 2016.
- CUSHNIE, T. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 44, n. 5, p. 377-386, 2014.
- DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf*. Ames: Iowa State University Press, 1998. 354p.

- DI GENOVA, B. M.; TONELLI, R. R. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Frontiers in microbiology*, v. 7, 2016.
- DIREKBUSARAKOM, S. Application of medicinal herbs to aquaculture in Asia. *Walailak Journal of Science and Technology*, v. 1, n. 1, p. 7-14, 2011.
- DRSATA, J.; ULRICHOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Sanguinarine and chelerythrine as inhibitors of aromatic amino acid decarboxylase. *Journal of enzyme inhibition*, v. 10, n. 4, p. 231-237, 1996.
- DVOŘÁK, Z.; VRZAL, R.; MAUREL, P.; et al. Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF- κ B in HeLa cells. *Chemico-biological interactions*, v. 159, n. 2, p. 117-128, 2006.
- EDERLI, B. B.; CARVALHO, C. B.; SALES, L. G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 2, p. 45-48, 2004.
- ESTRADA-ANGULO, A.; AGUILAR-HERNÁNDEZ, A.; OSUNA-PÉREZ, M.; et al. Influence of Quaternary Benzophenanthridine and Protopine Alkaloids on Growth Performance, Dietary Energy, Carcass Traits, Visceral Mass, and Rumen Health in Finishing Ewes under Conditions of Severe Temperature-humidity Index. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, v. 29, n. 5, p. 652, 2016.
- FAUBERT, G. M.; LITVINSKY, Y. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *Journal of Parasitology*, v. 86, n. 3, p. 495-500, 2000.
- FAYER, R.; UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiology Reviews*, v. 50, n. 4, p. 458-483, 1986.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of parasitology*, v. 91, n. 3, p. 624-629, 2005.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, v. 156, n. 3, p. 191-198, 2008.
- FAYER, R.; ORLANDI, P.; PERDUE, M. L. Virulence factor activity relationships for hepatitis E and *Cryptosporidium*. *Journal of water and health*, v. 7, n. S1, p. S55-S63, 2009.
- FERREIRA, L. O. *Perfil bioquímico e eletrolítico, equilíbrio ácido-base e transferência de imunidade passiva de bezerras oriundas de partos eutócicos e distócicos*. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 25, n. 1, p. 13-36, 2009.

- GARCIA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; ORDEN, J. A. et al. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 23, n. 3, p. 175-183, 2000.
- GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W.; et al. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 22, n. 1, p. 26-30, 2000.
- GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 24, n. 1, p. 19-39, 2008.
- GOOKIN, J. L.; NORDONE, S. K.; ARGENZIO, R. A. Host responses to *Cryptosporidium* infection. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 16, n. 1, p. 12-21, 2002.
- GOSMANN, G.; et al. *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*, 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Porto Alegre editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2010. c. 29, p. 765-792.
- GUDEV, D.; POPOVA-RALCHEVA, S.; MONEVA, P.; et al. Effect of supplemental Sangrovit on some biochemical indices and leukocytes phagocytic activity in growing pigs. *Archiva Zootechnica*, v. 7, p. 16-26, 2004.
- GUEDES, R. M. C. Infecção por *Lawsonia intracellularis*: um problema recorrente na suinocultura do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, n. 1, p. 77-80, 2008.
- GULLIKSEN, S. M.; JOR, E.; LIE, K. I.; et al. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of dairy science*, v. 92, n. 10, p. 5057-5066, 2009.
- HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. *Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária*, Manole, 2008. c. 14, p. 367-414.
- HARP, J. A.; WOODMANSEE, D. B.; MOON, H. W. Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *American journal of veterinary research*, v. 50, n. 12, p. 2117-2119, 1989.
- HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; et al. Alcaloides: Generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.;
- HERBERT, J. M.; AUGEREAU, J. M.; GLEYE, J.; et al. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 172, n. 3, p. 993-999, 1990.
- IBRAHIM, Z. A. Modulation of immunity and some biological functions of japanese quail by mannan oligosaccharide and B-glucan administration. *Egypt Poultry Science*, v. 31, p. 867-882, 2011.

- IMANPOOR, M. R.; ROOHI, Z. Effects of Sangrovit-supplemented diet on growth performance, blood biochemical parameters, survival and stress resistance to salinity in the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Aquaculture Research*, 2015.
- JANKOWSKI, J.; ZDUŃCZYK, Z.; JUŚKIEWICZ, J.; et al. Gastrointestinal tract and metabolic response of broilers to diets with the *Macleaya cordata* alkaloid extract. *Archiv für Geflügelkunde*, v. 73, n. 2, p. 95-101, 2009.
- JUSKIEWICZ, J.; GRUZAUSKAS, R.; ZDUNCZYK, Z.; et al. Effects of dietary addition of *Macleaya cordata* alkaloid extract on growth performance, caecal indices and breast meat fatty acids profile in male broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v. 95, n. 2, p. 171-178, 2010.
- JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; GRUŽAUSKAS, R.; et al. Comparative effects of dietary phytobiotic (*Macleaya cordata* alkaloid extract) and probiotic (*Pediococcus acidilactici* MA 18/5 M) preparations as single supplements or in combination on fermentative processes in the broiler chickens caeca. *Veterinary Medicine and Zootechnics*, v. 62, p. 50-55, 2013.
- KALKANOV, I.; DINEV, I.; DIMITROV, K. et al. Clinical and morphological investigations in a spontaneous *Cryptosporidium* enteritis outbreak in calves. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2015.
- KANTAS, D.; PAPATSIROS, V. G.; TASSIS, P. D.; et al. The effect of a natural feed additive (*Macleaya cordata*), containing sanguinarine, on the performance and health status of weaning pigs. *Animal Science Journal*, v. 86, n. 1, p. 92-98, 2015.
- KARIMI, M.; FOROUDI, F.; ABEDINI, M. R. Effect of Sangrovit on performance and morphology of small intestine and immune response of broilers. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, v. 11, p. 855-861, 2014.
- KHADEM, A.; SOLER, L.; EVERAERT, N.; et al. Growth promotion in broilers by both oxytetracycline and *Macleaya cordata* extract is based on their anti-inflammatory properties. *British Journal of Nutrition*, v. 112, n. 07, p. 1110-1118, 2014.
- KLEIN-JÖBSTL, D.; IWERSEN, M.; DRILLICH, M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 8, p. 5110-5119, 2014.
- KOSINA, P.; WALTEROVA, D.; ULRICHOVÁ, J.; et al. Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 1, p. 85-91, 2004.
- LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; AVILA, F. A. D.; et al. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n. 5, p. 313-319, 2004.

- LAPORTA, J.; FABRIS, T. F.; SKIBIEL, A. L.; et al. In utero exposure to heat stress during late gestation has prolonged effects on the activity patterns and growth of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 4, p. 2976-2984, 2017.
- LARSON, R. L.; TYLER, J. W. Reducing calf losses in beef herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 21, n. 2, p. 569-584, 2005.
- LEE, K. W.; KIM, J. S.; OH, S. T.; et al. Effects of dietary sanguinarine on growth performance, relative organ weight, cecal microflora, serum cholesterol level and meat quality in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2015.
- LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of biomedical research*, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2012.
- LI, W.; LI, H.; YAO, H.; et al. Pharmacokinetic and anti-inflammatory effects of sanguinarine solid lipid nanoparticles. *Inflammation*, v. 37, n. 2, p. 632-638, 2013.
- LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; OWENS, D. S. et al. *Cryptosporidium andersoni* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 91-95, 2000.
- LIU, G.; GUAN, G.; FANG, J.; et al. *Macleaya cordata* extract decreased diarrhea score and enhanced intestinal barrier function in growing piglets. *BioMed Research International*, v. 2016, 2016.
- LIU, J.; DENG, M.; LANCTO, C. A. et al. Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infection and immunity*, v. 77, n. 2, p. 837-849, 2009.
- LORENZ, I. Diarrhoea of the young calf: an update. In: XXIV WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2006, Nice, France. *Proceedings of the XXIV World Buiatrics Congress*. IVIS. p. 130-138.
- MACLACHLAN, N. James; DUBOVI, Edward J. (Ed.). *Fenner's veterinary virology*. Academic press, 2010, p.393-409.
- MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; STOIA, A.; et al. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 3, p. 217-221, 2003.
- MATSUURA, Y.; MATSUBAYASHI, M.; NUKATA, S. et al. Report of fatal mixed infection with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal calves. *Acta Parasitologica*, v. 62, n. 1, p. 214-220, 2017.
- MCCOLE, D. F.; ECKMANN, L.; LAURENT, F. et al. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and immunity*, v. 68, n. 3, p. 1710-1713, 2000.

- MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 56, n. 1, p. 75, 2014.
- MELE, R.; MORALES, M. A. G.; TOSINI, F. et al. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infection and immunity*, v. 72, n. 10, p. 6061-6067, 2004.
- MELLOR, S. Natural appetisers from plants. *Feed mix*, v. 9, n. 1, p. 29-31, 2001.
- MEMELINK, J.; VERPOORTE, R.; KIJNE, J. W. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in plant science*, v. 6, n. 5, p. 212-219, 2001.
- MEYER, A. M.; REED, J. J.; VONNAHME, K. A.; et al. Effects of stage of gestation and nutrient restriction during early to mid-gestation on maternal and fetal visceral organ mass and indices of jejunal growth and vascularity in beef cows. *Journal of animal science*, v. 88, n. 7, p. 2410-2424, 2010.
- MICKDAM, E.; KHIAOSA-ARD, R.; METZLER-ZEBELI, B. U.; et al. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids in vitro. *Anaerobe*, v. 39, p. 4-13, 2016.
- MILLEMANN, Y. Diagnosis of neonatal calf diarrhoea. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 160, n. 8/9, p. 404-409, 2009.
- MONTEIRO, A. P. A.; TAO, S.; THOMPSON, I. M.; et al. Effect of heat stress during late gestation on immune function and growth performance of calves: Isolation of altered colostrum and calf factors. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 10, p. 6426-6439, 2014.
- MOON, H.W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.172, n.4, p.443-448, 1978.
- MORENO, L. E. S.; CRUZ, R. B.; RUBIO, J. A. R. et al. Influencia de la adición de extracto de *Macleaya cordata* en la presencia de *Escherichia coli* en bovinos de engorda. In: *XIV Seminario de avances de investigación - Programa de maestría en ciencias agropecuarias*, 2015. p. 19-30.
- MORIN, M.; LARIVIEE, S.; LALLIER, R.; et al. Diarrhoea of newborn calves. II. Agents responsible for the disease on Quebec dairy farms. *Medecine Veterinaire du Quebec*, v. 10, n. 3, p. 60-65, 1980.
- MORIN, M.; LARIVIERE, S.; LALLIER, R. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 40, n. 3, p. 228, 1976.
- NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science*, v. 86, n. 4, p. 605-609, 2007.

NIU, X. F.; ZHOU, P.; LI, W. F.; et al. Effects of chelerythrine, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, on acute inflammation in mice. *Fitoterapia*, v. 82, n. 4, p. 620-625, 2011.

NIU, X.; FAN, T.; LI, W.; et al. The anti-inflammatory effects of sanguinarine and its modulation of inflammatory mediators from peritoneal macrophages. *European journal of pharmacology*, v. 689, n. 1, p. 262-269, 2012.

O' HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, v. 22, p. 623-643, 2006

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 132, n. 5, p. 1033-1044, 2013.

OBIANG-OBOUNOU, B. W.; KANG, O. H.; CHOI, J. G.; et al. *In vitro* potentiation of ampicillin, oxacillin, norfloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin by sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne pathogens and disease*, v. 8, n. 8, p. 869-874, 2011a.

OBIANG-OBOUNOU, B. W.; KANG, O. H.; CHOI, J. G.; et al. The mechanism of action of sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of toxicological sciences*, v. 36, n. 3, p. 277-283, 2011b.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L. *Cryptosporidium* virulence determinants—are we there yet? *International journal for parasitology*, v. 32, n. 5, p. 517-525, 2002.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P.; PACHECO, M. D.; et al. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, v. 8, n. 5-6, p. 479-484, 1971.

PĚNČÍKOVÁ, K.; KOLLÁR, P.; ZÁVALOVÁ, V. M.; et al. Investigation of sanguinarine and chelerythrine effects on LPS-induced inflammatory gene expression in THP-1 cell line. *Phytomedicine*, v. 19, n. 10, p. 890-895, 2012.

PETERSON, B. C.; BOSWORTH, B. G.; LI, M. H.; et al. Assessment of a phytogenic feed additive (Digestarom PEP MGE) on growth performance, processing yield, fillet composition, and survival of channel catfish. *Journal of the World Aquaculture society*. v. 45, n. 2, p. 206-212, 2014.

Phytobiotics feed additives. In: SANGROVIT®. Eltville, Alemanha. Disponível em <<http://www.phytobiotics.com/pt/produtos/sangrovit.html>> Acessado em 03/03/2017.

PICKLER, L.; BEIRÃO, B. C.; HAYASHI, R. M.; et al. Effect of sanguinarine in drinking water on Salmonella control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 22, n. 3, p. 430-438, 2013.

POHLEZ, J.; MOON, H.W.; CHEVILLE, N. F. et al. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 172, n. 4, p. 452, 1978.

PSOTOVA, J.; VECERA, R.; ZDARILOVA, A.; et al. Safety assessment of sanguiritrin, alkaloid fraction of *Macleaya cordata*, in rats. *Veterinarni medicina-praha-*, v. 51, n. 4, p. 145, 2006.

QUIGLEY, J. The role of oral immunoglobulins in systemic and intestinal immunity of neonatal calves. *Diamond V Mills, Cedar Rapid, Iowa, USA*. 2004.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF K.W. et al. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. ed. Elsevier, Philadelphia, 2007. 2156p.

RAIRAT, T.; CHUCHIRD, N.; LIMSUWAN, C. Effect sangrovit WS on growth, survival and prevention of *Vibrio harveyi* in rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, v. 37, n. 1, p. 19-29, 2013.

RAS, R.; HUYNH, K.; DESOKY, E. et al. Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *International journal for parasitology*, v. 45, n. 8, p. 567-573, 2015.

RAWLING, M. D.; MERRIFIELD, D. L.; DAVIES, S. J. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture*, v. 294, n. 1, p. 118-122, 2009.

REIF, J. S.; WIMMER, L.; SMITH, J. A. et al. Human cryptosporidiosis associated with an epizootic in calves. *American Journal of Public Health*, v. 79, n. 11, p. 1528-1530, 1989.

REYNOLDS, D. J.; MORGAN, J. H.; CHANTER, N.; et al. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Veterinary Record*, v. 119, n. 2, p. 34-39, 1986.

ROBBINS, R. C.; ARTUSO-PONTE, V. C.; MOESER, A. J.; et al. Effects of quaternary benzo (c) phenanthridine alkaloids on growth performance, shedding of organisms, and gastrointestinal tract integrity in pigs inoculated with multidrug-resistant *Salmonella* spp. *American journal of veterinary research*, v. 74, n. 12, p. 1530-1535, 2013.

RYAN, U.; HIJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. *International journal for parasitology*, v. 45, n. 6, p. 367-373, 2015.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; et al. It's official—*Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?. *Water Research*, v. 105, p. 305-313, 2016.

- SALTIJERAL-OAXACA, J. A.; GALICIA, L.; GUERRA, J. E.; et al. Influence of a feed additive on support of calves during initial growth phase. In: *Annual Meeting Abstracts - American Dairy Science Association, American Society of Animal Science*, 2015. p. 625.
- SANFORD, S. E.; JOSEPHSON, G. K. A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 23, n. 12, p. 343, 1982.
- SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L. et al. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary parasitology*, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.
- SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. *Veterinary Hematology*. LEA e Febiger, Philadelphia. 1975. p. 807
- SHAHIDUZZAMAN, Md.; DAUGSCHIES, A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology*, v. 188, p. 203-214, 2012.
- SILVA JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A. H.; ROCHA, C. M.; et al. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 8, p. 690-696, 2011.
- SILVA, R. A. M. Avaliação da sanguinarina sobre os parâmetros intestinais e sanguíneos de suínos por meio de diferentes modelos (in vitro, ex vivo e in vivo). 2014. 127f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SILVERLÅS, C.; VERDIER, K., EMANUELSON, U. et al. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. *Parasitology research*, v. 107, n. 6, p. 1435-1444, 2010.
- STEELE, M. I.; KUHLS, T. L.; NIDA, K. et al. A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infection and immunity*, v. 63, n. 10, p. 3840-3845, 1995.
- STIBOROVA, M.; VOSTALOVA, J.; ZDARILOVA, A.; et al. *Macleaya cordata* extract and Sangrovit genotoxicity. Assessment *in vivo*. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*, v. 152, n. 1, p. 35-39, 2008.
- SWEENEY, J. F.; NGUYEN, P. K.; ATKINS, K. B.; et al. Chelerythrine chloride induces rapid polymorphonuclear leukocyte apoptosis through activation of caspase-3. *Shock*, v. 13, n. 6, p. 464-471, 2000.
- TANAKA, S.; SAKATA, Y.; MORIMOTO, K.; et al. Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1. *Planta medica*, v. 67, n. 2, p. 108-113, 2001.

TAO, S.; MONTEIRO, A. P. A.; THOMPSON, I. M.; et al. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. *Journal of dairy science*, v. 95, n. 12, p. 7128-7136, 2012.

TEILLET, B.; COLIN, M.; LEBAS, et al. Performance of growing rabbits fed diets supplemented with Sangrovit® in interaction with the feeding plan. In: 10 TH WORLD RABBIT CONGRESS, 2012, Sharm El-Sheikh, Egypt. *Proceedings of the 10 th World Rabbit Congress*, September 3 - 6, 2012. p. 531 – 535.

THOMSON, S. *Cryptosporidiosis in farm livestock*. 2016. 226 f. PhD thesis, Institute of Biodiversity Animal Health and Comparative Medicine University of Glasgow.

TIZARD, I. R. *Veterinary immunology*, 9. ed. Saunders, 2012. 568p.

TSCHIRNER, K.; SUSENBETH, A.; WOLFFRAM, S. Influence of Sangrovit® supplementation on nitrogen balance and feed intake in growing pigs. In: 9° Symposium Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 2003, em Jena/Turingia, p. 275-279.

TYLER, J. W.; HANCOCK, D. D.; WIKSIE, S. E.; et al. Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 12, n. 2, p. 79-83, 1998.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 10, p. 1047-1058, 2002.

UPTON, S. J.; CURRENT, W. L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of parasitology*, p. 625-629, 1985.

VALARCHER, J.; HÄGGLUND, S. Bovine coronavirus. In: LEFEVRE, P. C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R.; et al. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. CABI, 2011. p. 545-552.

VARGAS JUNIOR, S. F.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; Adrien, M. L. et al. Surto de criptosporidiose em bezerros no Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 8, p. 749-752, 2014.

VIEIRA, S. L.; BERRES, J.; REIS, R. N.; et al. Studies with sanguinarine like alkaloids as feed additive in broiler diets. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 10, n. 1, p. 67-71, 2008a.

VIEIRA, S. L.; OYARZABAL, O. A.; FREITAS, D. M.; et al. Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acids. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 17, n. 1, p. 128-133, 2008b.

VIENNA, C. F.; GRAZ, R. B.; HOHENHEIM, R. C. et al. Study on the assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as additives for use in animal production. EFSA Supporting Publications. v. 4, p. 140-154, 2007. 297p.

- VRUBLOVA, E.; VOSTALOVA, J.; EHRMANN, J.; et al. The phytogetic feed additive Sangrovit modulates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Veterinarni Medicina*, v. 55, n. 12, p. 610-618, 2010.
- WANG, W.; DOLAN, L. C.; ALVENSLEBEN, S.; et al. Safety of standardized *Macleaya cordata* extract in an eighty-four-day dietary study in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2017.
- WILHELM, A. L.; MAQUIVAR, M. G.; BAS, S.; et al. Effect of serum calcium status at calving on survival, health, and performance of postpartum Holstein cows and calves under certified organic management. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 4, p. 3059-3067, 2017.
- WIRTH, M.; SCHMITT, J.; FISCHER, B. Evaluation of the effect of a plant alkaloid product in newborn German Holstein calves. In: *BOKU-Symposium Tierernährung*, 2014. p. 140-145.
- YANG, M.; ZOU, Y.; WU, Z. H.; et al. Colostrum quality affects immune system establishment and intestinal development of neonatal calves. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 10, p. 7153-7163, 2015.
- YAO, J. Y.; SHEN, J. Y.; LI, X. L.; et al. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Parasitology research*, v. 107, n. 5, p. 1035-1042, 2010.
- ZADROZNY, L. M.; STAUFFER, S. H.; ARMSTRONG, M. U. et al. Neutrophils do not mediate the pathophysiological sequelae of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal piglets. *Infection and immunity*, v. 74, n. 10, p. 5497-5505, 2006.
- ZDARILOVA, A.; VRUBLOVA, E.; VOSTALOVA, J.; et al. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 12, p. 3721-3726, 2008.
- ZDUNCZYK, Z.; GRUZAUSKAS, R.; JUSKIEWICZ, J.; et al. Growth performance, gastrointestinal tract responses, and meat characteristics of broiler chickens fed a diet containing the natural alkaloid sanguinarine from *Macleaya cordata*. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 19, n. 4, p. 393-400, 2010.
- ZHAO, L.; MATULKA, R. A.; VON ALVENSLEBEN, S.; et al. Residue study for a standardized *Macleaya cordata* extract in growing-finishing swine. *Open Journal of Animal Sciences*, v. 7, n. 2, p. 93, 2017.

Capítulo 2 - Efeito da suplementação dietética com alcaloides isoquinolínicos sobre parâmetros clínicos e hematológicos de bezerros neonatos com diarreia induzida por *Cryptosporidium parvum*

ABSTRACT

Diarrhea in neonatal calves is one of the main economic barriers to cattle breeding. As a strategy to minimize the damages caused by this disease, the use of antibiotics added to the food has been used in calves rearing. However, due to international requirements of the market for animal products, the use of antimicrobials in production animals is being restricted and alternative substances for use with this purpose are being investigated. The objective of this study was to evaluate the effects of the isoquinoline alkaloids (QBAs + PA) present in the standardized extract of *Macleaya cordata* on the diet of calves with diarrhea induced by inoculation with *Cryptosporidium parvum* oocysts on clinical, hemogasometric, blood count and serum biochemistry parameters. Twenty-six Holstein calves were distributed in two groups: SG (diet supplemented with 10g/day of the standardized extract of *M. cordata*) and CN (control diet, without additives). The animals were evaluated at basal moment (day of inoculation with 1×10^6 oocysts of *C. parvum*) and days of diarrhea (1st, 3rd, 5th and 7th days). Other potential enteropathogens such as coronavirus, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* (ETEC) and *Giardia* spp. in associations with *Cryptosporidium* in both groups with similar frequencies. The calves in both groups presented dehydration and compensated metabolic acidosis with greater intensity in the CN group. In the CN group, significant reductions in cholesterol and serum iron concentrations were observed, as well as worse leukogram parameters. Thus, the alkaloids present in the plant extract of *M. cordata* were beneficial to the animals during the episodes of diarrhea based on clinical and laboratory parameters, so this may be an alternative strategy to minimize the consequences of the disease.

KEY WORDS: *Cryptosporidium parvum*, enteropathogens, neonatal diarrhea, sangrovit, standardized plant extract, anti-inflammatory

RESUMO

A diarreia em bezerros neonatos corresponde a um dos principais entraves econômicos na bovinocultura. Como estratégia para minimizar os prejuízos decorrentes da doença o uso de antibióticos adicionado ao alimento vem sendo empregado na criação de bezerros. No entanto, em razão de exigências internacionais do mercado de produtos de origem animal e do melhor conhecimento do microbioma intestinal e suas interações, o uso de antimicrobianos em animais de produção está sendo revisto e substâncias alternativas para o uso com essa finalidade são alvos de pesquisas. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos sobre parâmetros clínicos, hemogasométricos, hemograma e bioquímica sérica do uso dos alcaloides isoquinolínicos (QBAs+PA) presentes no extrato vegetal padronizado de *Macleaya cordata* fornecido na dieta de bezerros com diarreia induzida por inoculação com oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Foram utilizados 26 bezerros neonatos da raça Holandês distribuídos aleatoriamente em dois grupos: SG (dieta suplementada com 10g/dia do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle,

sem aditivos). Foram realizadas avaliações no momento basal (dia da inoculação com 1×10^6 oocistos de *C. parvum*) e nos dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). Foram diagnosticados outros enteropatógenos como: coronavírus, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* (ETEC) e *Giardia* spp. em associações com *Cryptosporidium* em ambos os grupos com frequências semelhantes. Os bezerros em ambos os grupos apresentaram desidratação e acidose metabólica compensada com maior intensidade no grupo CN. No grupo CN foram também observadas reduções significativas das concentrações de colesterol e ferro sérico além de parâmetros desfavoráveis no leucograma. Dessa forma, os alcaloides presentes no extrato vegetal de *M. cordata* foram benéficos para os animais durante os episódios de diarreia com base em parâmetros clínicos e laboratoriais, assim essa pode ser uma estratégia alternativa para minimizar as consequências da doença.

PALAVRAS CHAVE: *Cryptosporidium parvum*, enteropatógenos, diarreia neonatal, sangrovit, extrato vegetal padronizado, anti-inflamatório

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a crescente demanda mundial por produção de alimentos e a busca por maior produtividade, motivaram o emprego de substâncias promotoras de crescimento na dieta animal, como os antibióticos. Essa estratégia é utilizada principalmente em sistemas de criação intensiva, onde os animais são submetidos a condições desafiadoras em termos de imunidade e carga infecciosa (Bischoff et al., 2005). Porém, desde a imposição da União Europeia restringindo o uso de antimicrobianos na produção animal (European Union, 2005) existe um grande apelo pela busca de substâncias alternativas para o uso com essa finalidade. Nesse contexto, o uso de compostos fitogênicos na produção animal tem sido uma alternativa bem aceita pela comunidade internacional (Vieira et al, 2008).

O extrato padronizado da planta *Macleaya cordata* foi avaliado com esse propósito na criação de aves (Lee et al., 2015; Bavarsadi et al., 2016; Abudabos et al., 2016), suínos (Blank et al., 2010; Zhao et al., 2017), ruminantes (Aguilar-Hernández et al., 2016; Estrada-Angulo et al., 2016) e animais aquáticos (Rawling et al., 2009; Rairat et al., 2013; Imanpoor e Roohi, 2015). O extrato dessa planta contém alcaloides isoquinolínicos em concentrações biologicamente ativas que incluem uma fração de alcaloides quaternários benzo [c] fenantridina (QBAs) representados principalmente pela sanguinarina e a queleritrina e uma fração de alcaloides de protopina (PA) (Croaker et al., 2016). Essas substâncias possuem propriedades clinicamente interessantes como a ação anti-inflamatória (Chaturvedi et al., 1997; Dvorak et al., 2006) e antimicrobiana (Croaker et al., 2016), o que faz desse extrato um potencial substituto à adição de antibióticos convencionais usados na dieta de animais (Liu et al., 2016).

De acordo com Vrublova et al. (2010), o uso de componentes anti-inflamatórios na alimentação pode ser a chave para o melhor crescimento e saúde de animais de produção. Avaliações prévias mostraram que o extrato padronizado de *M. cordata* na dieta foi capaz de modular lesões intestinais em ratos (Vrublova et al., 2010), melhorar índices de saúde intestinal em aves (Bavarsadi et al., 2016) e atenuar a diarreia em leitões (Liu et al., 2016). Embora a diarreia em bezerros neonatos seja um problema de grande importância, não há referências que avaliem o uso desses alcaloides em animais nessas condições.

A diarreia neonatal de bezerros corresponde a um dos principais entraves para criação de bovinos de leite e corte, devido à alta morbidade e mortalidade que representa para o sistema (Lagoni et

al., 2004; Carvalho et al., 2014). As consequências da diarreia incluem desidratação e distúrbios no metabolismo ácido-base, eletrolítico e energético (Seifi et al., 2006; Guzelbektes et al., 2007; Tsukano et al., 2018). Esses desequilíbrios podem influenciar direta ou indiretamente a sobrevivência dos animais acometidos (Naylor, 1989; Freitas, 2009).

A síndrome diarreica é de carácter multifatorial e vários agentes etiológicos virais, bacterianos e parasitários podem estar envolvidos na patogênese de forma isolada ou em infecções mistas (Snodgrass et al., 1986; Coura et al., 2015). Entretanto, atualmente sabe-se da relevância de *Cryptosporidium parvum* como agente causador de diarreia em bezerros neonatos, devido à sua alta incidência (Carvalho et al., 2014) e aos mecanismos pelos quais provoca quadros de diarreia por má digestão/má absorção, secreção e inflamação (Gookin et al., 2002; Foster e Smith, 2009; Certad et al., 2017).

Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar os efeitos do uso dos QBAs+PA presentes no extrato vegetal padronizado de *M. cordata* fornecido na dieta líquida de bezerros inoculados experimentalmente com *C. parvum* sobre parâmetros clínicos, hemogasométricos, hematológicos e bioquímica sérica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e instalações

Todos os procedimentos descritos nesse trabalho foram executados com autorização prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o protocolo nº 279/2015.

Foram utilizados 26 bezerros recém-nascidos da raça Holandês. Esses animais foram pré-selecionados para o experimento seguindo os critérios de peso mínimo ao nascimento de 32 kg e proteína total sérica com 24 horas de vida $\geq 5,5\text{g/dl}$ para estimar uma transferência de imunidade passiva adequada (Godden, 2008).

Os animais foram adquiridos em uma propriedade de exploração leiteira intensiva, no município de Inhaúma-MG. Os partos ocorreram em um galpão, do tipo *free stall*, com acompanhamento de um membro da equipe de pesquisa para a realização dos cuidados iniciais com os neonatos e minimizar a possibilidade de infecções por enteropatógenos ambientais mantendo os animais em local higienizado.

Os bezerros receberam, na quantidade de 10% do seu peso corporal, o colostro proveniente da propriedade em que nasceram. Esse material possuía alta qualidade classificada de acordo com a densidade específica mensurada por colostrômetro e estava armazenado sob temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no banco de colostro da fazenda.

Após os procedimentos de colostragem, cura de umbigo e identificação, os bezerros foram transportados para a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram alojados em um galpão fechado com baias individuais, onde permaneceram por um período de adaptação, durante sete dias. Posteriormente os bezerros foram alocados dentro do mesmo galpão, em outra instalação, em sistema *tie stall*, com comedouros individuais.

Previamente ao início do experimento, o ambiente onde os animais permaneceram foi higienizado para a remoção da matéria orgânica das superfícies, utilizando vassoura para a remoção de todas as sujidades do chão e paredes, e esfregar o local com água e detergente neutro. Após o enxague do detergente, foi aplicado hipoclorito 2% sobre as superfícies deixando o produto agir por 10 minutos e posteriormente enxaguando com água limpa. Após a secagem natural das superfícies foi aplicado fogo sobre o chão e as paredes utilizando um maçarico a gás. Os animais foram mantidos no galpão, em tapetes de borracha individuais com acesso a água *ad libitum*. Durante o período experimental o ambiente onde os animais foram mantidos e os tapetes de borracha foram higienizados diariamente pela manhã por lavagem com detergente neutro e água limpa sob pressão.

Durante o período experimental os animais foram alimentados exclusivamente com duas refeições diárias de três litros de leite em pó integral¹ reconstituído a 13% em água a 39°C e água disponível *ad libitum*.

Delineamento experimental

Os 26 bezerros foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 13 animais cada. Durante todas as avaliações, no grupo tratado (SG) os animais receberam 5 g de um extrato vegetal padronizado (Sangrovit® CS) acrescido ao volume de leite de cada uma das duas refeições diárias, a partir da primeira refeição após o colostro. Os animais do grupo controle (CN) não receberam nenhum aditivo a sua dieta. No terceiro dia de vida, todos os bezerros foram desafiados pela inoculação por via oral em dose única de 1×10^6 oocistos de *C. parvum* e nos dias subsequentes os animais foram avaliados diariamente quanto a manifestação de diarreia. Ambos os grupos não receberam qualquer medicação antimicrobiana ou anti-inflamatória durante os dias de diarreia.

Extrato vegetal padronizado

O aditivo alimentar utilizado consiste em um extrato padronizado da planta *M. cordata*. O produto é conhecido pelo nome comercial de Sangrovit® CS e produzido pela empresa Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH, Eltville, Alemanha. O Sangrovit® CS contém como princípios ativos de interesse, uma fração de QBAs + PA que contém principalmente sanguinarina e queleritrina, padronizada para 0,15% de sanguinarina. A dosagem utilizada no grupo tratado seguiu as recomendações do fabricante.

Inóculo de desafio

Os inóculos para o desafio foram compostos de oocistos purificados de *C. parvum* oriundos de um caso de campo de criptosporidiose. Para caracterização específica dos oocistos as amostras de fezes para o preparo dos inóculos foram mantidas conservados sob refrigeração a 4°C por cerca de um mês em solução de bicromato de potássio a 2,5%, na proporção de 1:1, no laboratório do setor de Clínica de Ruminantes da Universidade Federal de Minas Gerais. A partir das fezes estocadas, os oocistos foram purificados e ressuspensos em um mililitro de solução salina (0,9% NaCl) conforme Carvalho (2017) e posteriormente quantificados por contagem em câmara de

¹ Leite em pó integral (ingrediente para alimentação animal) – Itambé®

Neubauer para mensuração de oocistos/ μL . Os inóculos purificados foram previamente testados para garantir a isenção de bactérias e fungos através de cultura em ágar sangue em aerobiose e anaerobiose a 37°C e ágar sabouraud a 32°C incubados por 24 horas para pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente (Carvalho, 2017).

A caracterização molecular da amostra foi realizada de acordo com Carvalho (2017), utilizando $300\ \mu\text{L}$ da amostra purificada, que passaram por sonicação e a partir do material sonicado foi realizada a extração de DNA com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA, Madison, Wisconsin) seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação do DNA teve como gene alvo o SSU rRNA para a realização da *nested* PCR (*nPCR*) conforme Xiao et al. (1999) (Quadro 4).

Quadro 3: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *Cryptosporidium*

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
1° reação	TTCTAGAGCTAATACATGCG	SSUCryptoF1	SSU rRNA	1325	Xiao et al., 1999
	CCCATTTTCCTCGAAACAGGA	SSUCrptoR1			
2° reação	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	SSUCryptoF1	SSU rRNA	819-825	Xiao et al., 1999
	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	SSUCryptoR1			

O produto da *nPCR* foi purificado e utilizada para a caracterização da amostra de acordo com o sequenciamento genético (Carvalho, 2017). A identidade da sequência obtida foi confirmada como *C. parvum* por comparação com as sequências disponíveis no GenBank utilizando o software BLAST (Altschul et al., 1990). A amostra sequenciada e editada foi depositada no *genbank* com o número KY619841.

Amostras para avaliação de enteropatógenos

A manifestação da diarreia foi avaliada diariamente pela inspeção das fezes obtidas por estímulo tátil diretamente na ampola retal dos bezerros. Amostras de fezes de cada animal foram coletadas no momento basal (dia da inoculação/3° dia de vida) e quando identificada a presença de diarreia (score de consistência fecal ≥ 2) (quadro 6) coletas foram realizadas no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia de diarreia, totalizando 5 amostras por animal.

O diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. foi realizado no laboratório de Clínica de Ruminantes da EV-UFMG, para tanto uma alíquota de 2 g de fezes foi diluída em 4 mL de formalina (10%) e armazenada em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram submetidas ao método de centrífugo-sedimentação em formol-éter (3:1) e coloração modificada de Ziehl-Neelsen para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp (Garcia e Bruckner, 1988) através da observação de 80 campos em microscópio óptico no aumento de 1000x.

A presença de outros enteropatógenos potencialmente causadores de diarreia associados ao *C. parvum* foi avaliada. Para tanto, a pesquisa de cistos de *Giardia* sp. foi realizada no laboratório de Clínica de Ruminantes da EV-UFMG através do método de Richie (1948). A concentração de cistos foi realizada por centrífugo-sedimentação em formol-éter (3:1).

O diagnóstico de rotavírus e coronavírus foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal da EV-UFMG e foram utilizadas alíquotas de fezes diluídas na proporção 1:3 em tampão salina fosfato (PBS) 1X. As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 3000 x g por 15 min a 4°C e o sobrenadante coletado para extração do RNA total presente nas fezes pelo método de TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), conforme descrito pelo fabricante. O material extraído foi eluído em 50 µL de água ultra-pura estéril (Invitrogen Life Technologies, EUA) e utilizado posteriormente para a RT- *semi-nested* PCR (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa *semi-nested*). Para a detecção de coronavírus foi realizada uma RT-*semi nested* PCR, que amplifica parte de gene que codifica o nucleocapsídeo viral (N), conforme *primers* descritos por Asano et al. (2010). Para rotavírus bovino (grupo A) foi feita uma RT-*semi nested* PCR, com *primers* que amplificam parte do gene VP1, altamente conservado em diferentes genótipos de rotavírus do grupo A (Asano et al., 2010). Na detecção de ambos os vírus, a primeira reação foi feita utilizando-se o SuperScript III™ One-step RT-PCR System with Platinum Taq, com os *primers* específicos para cada vírus. Para a desnaturação do RNA fita dupla dos rotavírus, 5 µL do RNA extraído foi submetido a desnaturação a 95 °C durante 5 min seguidos de um banho de gelo por 10 minutos. Para a realização da segunda reação de PCR, o produto da primeira reação foi adicionado ao mix de PCR da segunda reação. Os *primers* específicos e o tamanho amplificado utilizado em cada reação estão descritos no quadro 5.

Quadro 4: Sequências de oligonucleotídeos para a detecção de coronavírus e rotavírus bovino e tamanho dos amplicons (Asano et al., 2010).

Reação	Primers	Sequências dos iniciadores (5'-3')	Amplicon (pb)
Coronavírus			
1ª	BCOV₁ (senso)	AAGAGCTCAAYCCAAGCAAAGCTGY	463
	BCOV₂ (antisenso)	AGCAGACCTTCCTGAGCCTTCAAT	
2ª	BCOV₁ (senso)	AAGAGCTCAAYCCAAGCAAAGCTGY	306
	BCOV₃ (antisenso)	TCAATRTCAGGTGCCATACTGGTCT	
Rotavírus A			
1ª	ROT₁ (senso)	CTCTGGCAAARCTGGTGTC	492
	ROT₂ (antisenso)	CATTCGACGCTGATGACATY	
2ª	ROT₁ (senso)	CTCTGGCAAARCTGGTGTC	228
	ROT₃ (antisenso)	ARCAATCRACCAACCACTCCTGTA	

pb = pares de bases

O controle positivo de rotavírus grupo A foi cedido do banco de amostras do setor de virologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e o controle positivo de coronavírus bovino foi obtido do banco de amostras do setor de Clínica de ruminantes da Escola de Veterinária da UFMG. Como controle negativo, foi utilizada água tratada com 0,1% de dietilpirocabonato (água DEPC). Os produtos da segunda reação de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando 12µL do amplicon corados com brometo de etídio a 0,1 µg/µL e observados sob luz ultravioleta.

Outra alíquota de fezes foi coletada com o auxílio de um *swab* estéril, enviada ao Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da EV-UFMG e utilizada para o isolamento de *Salmonella* spp. (Ramos et al., 2018). Resumidamente, as amostras fecais foram incubadas em caldo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, EUA) seguido de plaqueamento em ágar entérico Hektoen (BD, Alemanha). A

identificação do gênero *Salmonella* foi realizada através de PCR conforme descrito por Kwang et al. (1996).

Para o isolamento de *Escherichia coli*, as amostras fecais foram plaqueadas em ágar MacConkey (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e incubadas por 24 horas a 37° C. Até três unidades formadoras de colônias, caracterizadas por fermentação de lactose foram identificadas usando uma PCR específica para identificação de *E. coli* (Mcdaniels al., 1996). Para a caracterização dos patótipos mais comumente associados à diarreia de bezerros, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), foi realizada a identificação da presença de genes que codificam os fatores de virulência por PCR multiplex (Franck et al., 1998). As cepas de referência utilizadas foram: EDL933 (eae, Stx1, Stx2) e B41 (F41, F5, Sta).

Hemogasometria, bioquímica sérica e hemograma

No dia da inoculação, no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia de diarreia, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular para avaliação hemogasométrica, bioquímica sérica e hemograma.

Na avaliação hemogasométrica foram mensuradas as concentrações sanguíneas de sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cloreto (Cl⁻), pH sanguíneo, pressão de dióxido de carbono (PCO₂), dióxido de carbono total (TCO₂), nitrogênio ureico do sangue (BUN), bicarbonato (HCO₃⁻), excesso de base (BE), diferença aniônica (AnGap) e glicose. Para tanto, amostras de sangue foram colhidas em uma seringa sem anticoagulante para avaliação imediata no aparelho portátil modelo IStat (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ) utilizando cartuchos EC8+. A variação da concentração sanguínea de bicarbonato foi calculada subtraindo-se do valor de cada momento de diarreia, o valor observado na coleta basal de cada animal através da equação abaixo:

$$\Delta\text{HCO}_3^- = \text{HCO}_3^- \text{ Atual} - \text{HCO}_3^- \text{ Basal}$$

Aqueles bezerros que atingiram uma variação de bicarbonato $\geq 9\text{mEq/L}$ ($\Delta\text{HCO}_3^- \geq 9\text{mEq/L}$) receberam tratamento suporte com fluidoterapia e foram excluídos das análises hematológicas do experimento. Esse ponto de corte se deve ao fato de que bezerros diarreicos com 10mEq/L de déficit de base são considerados como casos graves de acidose metabólica, com prognóstico reservado (Nakagawa et al., 2007; Bellino et al., 2012).

Outras amostras de sangue foram coletadas em dois tubos, um com anticoagulante (EDTA) e um sem anticoagulante. As amostras de sangue coletadas nos tubos com EDTA foram homogeneizadas e utilizadas para contagem de células sanguíneas por impedância em aparelho automático (Abacus Jr. Vet-Diatron). Para contagem diferencial de leucócitos e observação morfológica celular, foram confeccionados esfregaços sanguíneos em lâminas coradas com kit panótico rápido (LaborClin®, São Paulo, Brasil). A avaliação do volume globular (VG) foi realizada pelo método de microhematócrito e os valores de fibrinogênio e proteína plasmática total (PPT) foram obtidos através da refratometria (Thrall et al., 2012).

Amostras de sangue coletadas em tubos, sem anticoagulante, foram centrifugadas em centrífuga própria para tubos, modelo 206-BL, Fanem® em rotação de 2000 G durante 10 minutos para

separação e alíquotagem do soro. As alíquotas de soro foram então armazenadas a -20°C até a realização das análises bioquímicas dos seguintes analitos: proteína total sérica, albumina, ureia, creatinina, creatina quinase total (CK), lactato total, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), colesterol total, triglicérides, cálcio total, fósforo, magnésio, ferro e cobre em um aparelho espectrofotômetro semiautomático (Cobas Mira Plus®) com utilização de kits comerciais (Biotécnica®, Varginha, MG). A concentração das globulinas foi obtida pela diferença da concentração das proteínas totais e da albumina.

Avaliação clínica

No dia da inoculação, no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia de diarreia, entre as oito e dez horas da manhã, foi realizado o exame clínico dos animais segundo Dirksen et al (1993), para estabelecer os seguintes parâmetros clínicos: escore de consistência fecal, comportamento, frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura retal, turgor cutâneo, retração de globo ocular e tempo de perfusão capilar (TPC). Imediatamente após a coleta da urina por estímulo à micção natural, a densidade urinária foi avaliada com a utilização de um refratômetro (RHC-200ATC, Megabrix®) e o pH da urina foi avaliado utilizando pHmetro digital portátil (Phtek®).

Por serem relacionados diretamente com a desidratação, os parâmetros de comportamento, escore de consistência fecal, turgor cutâneo, retração de globo ocular e TPC foram agrupados para formar um escore clínico de desidratação numérico, conforme a quadro 6. O quadro 7 apresenta o grau da desidratação conforme o somatório dos escores obtidos no quadro 6.

Quadro 5: Pontuação dos escores observados no exame físico utilizados para obter o cálculo do escore clínico de desidratação e para a interpretação do grau de desidratação no momento basal e no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia de diarreia.

Parâmetro avaliado	Escore
Escore de consistência fecal	0 = Consistência fecal normal
	1 = fezes com consistência pastosa
	2 = fezes aquosas
	3 = fezes líquidas
	4 = fezes líquidas com sangue
Escore de comportamento	0 = Normal
	1 = Apático
	2 = Deprimido
	3 = Comatoso
Turgor cutâneo	0 ≤ 1 segundo
	1 = 2 segundos
	2 = 3 – 4 segundos
	3 = ≥ 5 segundos
Retração de globo ocular	0 ≤ 1mm
	1 = 2 – 3 mm
	2 = 4 – 5 mm
	3 = ≥ 6 mm
Tempo de perfusão capilar	0 = ≤ 2 segundos
	1 = 3 segundos
	2 = 4 segundos
	3 = ≥ 5 segundos

Quadro 6: Interpretação do grau de desidratação de acordo com a pontuação do escore observado no exame físico.

Grau de desidratação no exame físico				
Pontuação MIN/MAX	Fisiológico	Discreto	Moderado	Grave
0 – 16	0 – 1	2 – 5	6 – 9	10– 16

Análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com os tratamentos na parcela e os tempos de avaliação nas subparcelas. Foram utilizadas 13 repetições por tratamento. Os dados foram avaliados quanto a normalidade através do teste *Kolmogorov–Smirnov*. Na comparação das médias entre os grupos, a análise das variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada através do teste t e para aquelas que não passaram no teste de normalidade foi empregado o teste não paramétrico *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Na comparação entre momentos das médias de cada grupo, a análise das variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada através do teste *Ducan* e para aquelas que não passaram no teste de normalidade foi utilizado o teste não paramétrico *Friedman*. A comparação da frequência de enteropatógenos observados foi realizada pelo teste exato de *Fisher*. Os dados foram analisados no software estatístico Infostat versão 2018 com nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A infecção experimental com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* provocou diarreia em 84,62% (11/13) dos bezerros no grupo SG e em 100% (13/13) dos animais do grupo CN. Os procedimentos de fluidoterapia naqueles animais que necessitaram do suporte foram realizados em momentos semelhantes em ambos os grupos ($p = 0,90$) sendo necessária após o início da diarreia em média aos $4 \pm 1,41$ dias no grupo SG e aos $3,88 \pm 1,05$ dias no grupo CN.

Outros potenciais enteropatógenos de bezerros como coronavírus, *Salmonella* spp. e ETEC foram observados desde a coleta basal (dia da inoculação) em ambos os grupos com frequências semelhantes (figura 8).

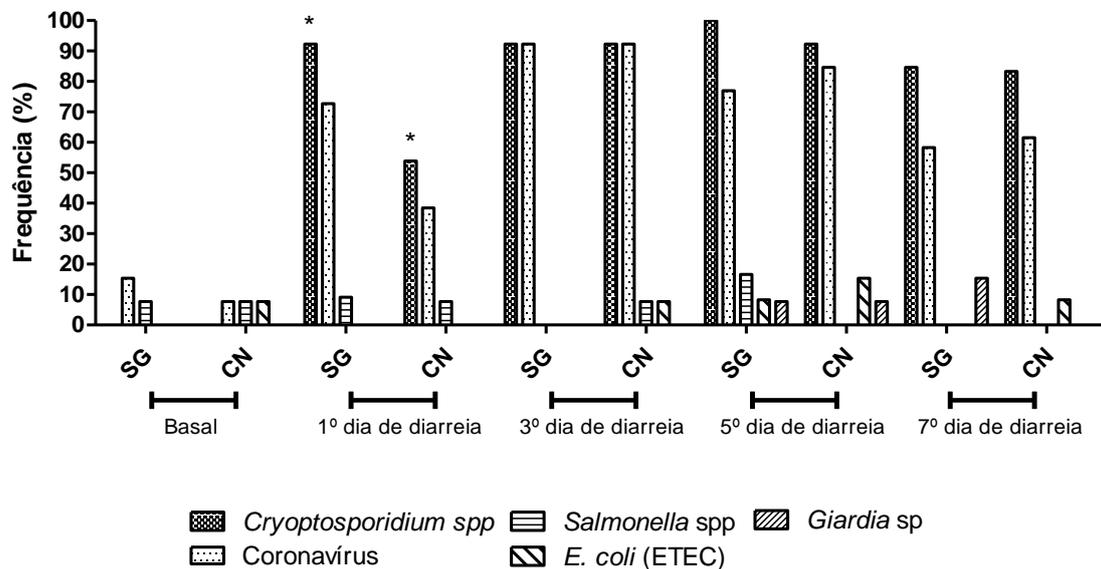


Figura 4: Frequência (%) de enteropatógenos excretados nas fezes de bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). Os valores de frequência com um asterisco sobrescrito (*) são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) no teste exato de Fisher.

Cistos de *Giardia* sp também foram observados a partir do quinto dia de diarreia sem diferença entre os grupos. A presença de rotavírus não foi identificada em nenhuma das observações. As análises aqui realizadas demonstram que entre os agentes etiológicos pesquisados, o protozoário *C. parvum*, utilizado como desafio, foi predominante sobre os demais a partir do primeiro dia de diarreia, sendo observado com maior frequência nos dois grupos e em todos os dias de diarreia observados (figura 8). No primeiro dia de diarreia visualiza-se maior frequência de bezerros excretando oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes no grupo SG ($p = 0,039$). Associações entre patógenos foram observadas em todos os dias de diarreia, sendo a ocorrência mais comum entre *Cryptosporidium* e coronavírus, atingindo até 76,92% (10/13) no terceiro dia de diarreia. Não houve diferença significativa entre os grupos na frequência de associações em nenhum momento (Tabela 2).

Tabela 1: Frequência (%) de associações de agentes infecciosos entéricos observados em bezerras experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). As frequências de associações não foram significativamente diferentes entre os grupos em nenhum momento.

Tipo de associação	Basal		1ºd diarreia		3ºd diarreia		5ºd diarreia		7ºd diarreia	
	SG	CN	SG	CN	SG	CN	SG	CN	SG	CN
<i>Cryptosporidium</i> /Coronavírus	0	0	46,15	15,38	76,92	76,92	61,54	53,84	46,15	46,15
<i>Cryptosporidium</i> / <i>Salmonella</i>	0	0	0	7,69	0	7,69	0	7,69	0	0
<i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i>	0	0	0	0	0	0	7,69	0	7,69	0
<i>Cryptosporidium</i> /ETEC	0	0	0	0	0	0	0	7,69	0	0
<i>Cryptosporidium</i> /Coronavírus/ <i>Samonella</i>	0	0	7,69	0	0	0	15,38	0	0	0
<i>Cryptosporidium</i> /Coronavírus/ETEC	0	0	0	0	0	7,69	7,69	7,69	0	0
<i>Cryptosporidium</i> /Coronavírus/ <i>Giardia</i>	0	0	0	0	0	0	0	7,69	7,69	0

Sinais clínicos relacionados à diarreia foram observados em ambos os grupos, porém, nos parâmetros de frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura retal, densidade urinária e pH urinário não foram observadas diferenças entre grupos ($p > 0,05$) (Figura 9). Entre os momentos foi possível verificar que a frequência respiratória reduziu significativamente em ambos os grupos em relação a observação no momento basal. Na frequência cardíaca foi observada redução significativa no grupo SG a partir do terceiro dia de diarreia enquanto o mesmo somente foi observado no grupo CN no sétimo dia de diarreia. Quanto a temperatura retal, embora o grupo CN tenha apresentado médias superiores ao grupo SG, não foram verificadas variações significativas entre os momentos em nenhum dos grupos. No pH de urina, foi observado no grupo SG aumento significativo em relação ao momento basal apenas no primeiro dia de diarreia por outro lado, no grupo CN foi observada diminuição significativa no terceiro dia de diarreia. Na densidade urinária, houve redução significativa no grupo SG a partir do primeiro dia de diarreia, enquanto no grupo CN esse parâmetro se manteve estável sem variações significativas nos momentos avaliados.

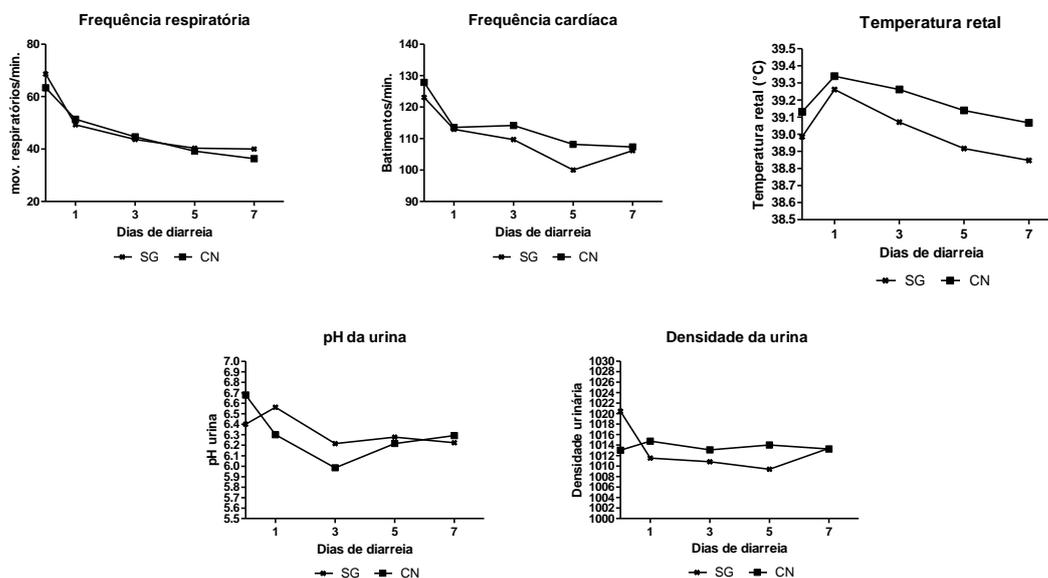


Figura 5: Parâmetros clínicos de bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1^o, 3^o, 5^o e 7^o). No ponto com um asterisco sobrescrito (*) houve diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) no teste *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

Na avaliação do escore clínico de desidratação foi possível observar que os animais dos dois grupos apresentaram algum nível de desidratação. As médias dos escores de desidratação dos animais do grupo SG se mantiveram no intervalo classificado como desidratação discreta conforme o quadro 7. Enquanto isso, na média os animais do grupo CN no terceiro, quinto e sétimo dia de diarreia se apresentaram no nível de desidratação moderada, sendo que as médias do grupo CN apresentaram escores mais elevados que o grupo SG em todos os momentos da diarreia, porém significativamente diferentes apenas no sétimo dia ($p = 0,038$) (Figura 10).

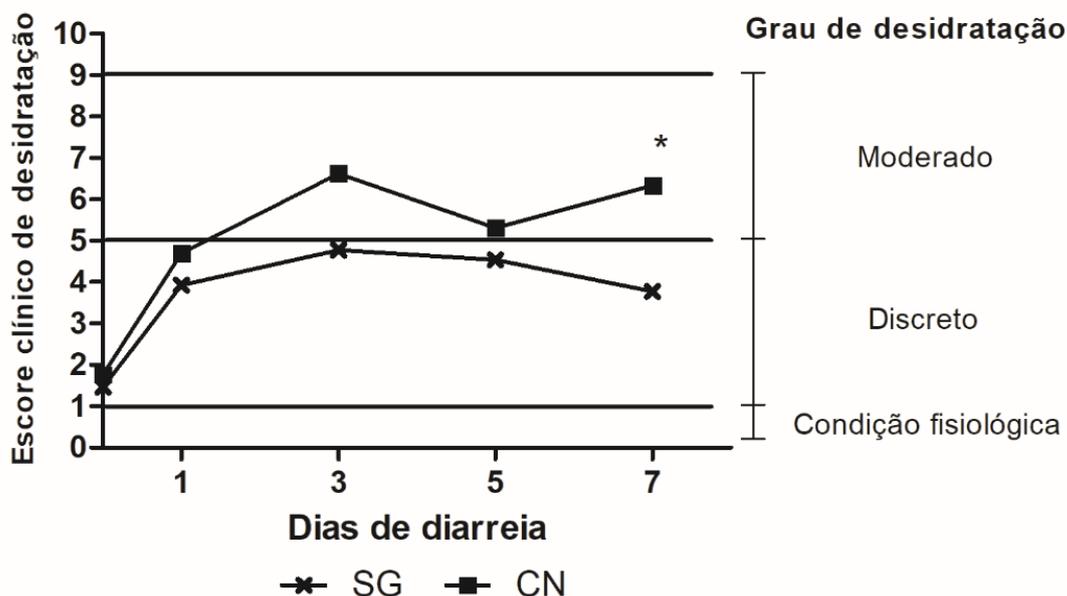


Figura 6: Escore clínico de desidratação e grau de desidratação de bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º). No ponto com um asterisco sobrescrito (*) houve diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) no teste *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

Os resultados das avaliações hemogasométricas estão apresentados na tabela 3 e mostraram alterações semelhantes nos parâmetros avaliados nos dois grupos. Diferenças significativas entre os grupos foram observadas apenas no momento basal, quando o grupo CN apresentou TCO_2 maior ($p = 0,033$) que o grupo SG e íon cloreto menor ($p = 0,017$) que o grupo suplementado. Variações entre momentos foram observadas nos parâmetros de pH sanguíneo, HCO_3^- , BE e TCO_2 em ambos os grupos a partir do terceiro dia de diarreia, com redução significativa em relação ao momento basal. Os valores de PCO_2 não variaram significativamente entre momentos em ambos os grupos. No grupo SG, os níveis de AnGap sofreram redução significativa, em relação ao valor basal, apenas no sétimo dia de diarreia. Enquanto no grupo CN variações significativas foram notadas entre os momentos avaliados: BUN aumentou no quinto dia de diarreia, sódio reduziu no terceiro e quinto dia de diarreia, cloreto aumentou no sétimo dia de diarreia, potássio aumentou no quinto dia de diarreia e glicose reduziu no sétimo dia de diarreia.

Tabela 2: Média, desvio padrão e intervalos de referência de parâmetros hemogasométricos observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 10g/dia do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1°, 3°, 5° e 7°).

Item	Grupo	Basal	1° D	3° D	5° D	7° D	Referência
pH	SG	7,44 ± 0,04 ^a	7,41 ± 0,04 ^a	7,38 ± 0,031 ^b	7,37 ± 0,03 ^b	7,38 ± 0,05 ^b	7,399 – 7,42 ¹
	CN	7,45 ± 0,04 ^a	7,44 ± 0,04 ^{ab}	7,37 ± 0,06 ^{bc}	7,36 ± 0,06 ^c	7,41 ± 0,021 ^{abc}	
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	SG	29,48 ± 2,25 ^a	27,52 ± 1,58 ^{ab}	25,72 ± 2,86 ^{bc}	24,99 ± 2,79 ^c	27,05 ± 2,98 ^{bc}	29,55 – 30,6 ¹
	CN	31,14 ± 1,92 ^a	29,48 ± 2,25 ^a	24,56 ± 4,04 ^b	24,31 ± 4,02 ^b	28,18 ± 1,69 ^a	
BE (mEq/L)	SG	5,38 ± 2,53 ^a	3 ± 1,84 ^{ab}	0,38 ± 3,25 ^{bc}	0 ± 3,44 ^c	1,9 ± 3,54 ^{bc}	4,84 – 6,08 ¹
	CN	7,23 ± 2,35 ^a	5,38 ± 2,5 ^{3ab}	-0,77 ± 5,04 ^b	-1,87 ± 6,39 ^c	3,5 ± 2,08 ^{ab}	
T CO ₂ (mEq/L)	SG	30,77 ± 2,24 ^{Aa}	28,73 ± 1,56 ^{ab}	27 ± 2,77 ^b	26,45 ± 3,21 ^b	28,5 ± 3,06 ^{ab}	30,9 – 32,02 ¹
	CN	32,62 ± 1,89 ^{Ba}	30,77 ± 2,24 ^{ab}	25,85 ± 4,06 ^b	25,71 ± 4,03 ^b	29,25 ± 1,71 ^{ab}	
P CO ₂ (mm Hg)	SG	43,08 ± 4,39	43,18 ± 4,8	43,18 ± 2,9	43,41 ± 3,89	46,06 ± 5,52	46,09 - 48,25 ¹
	CN	44,67 ± 3,64	43,08 ± 4,39	41,89 ± 3,3	42,4 ± 2,68	44,83 ± 2,14	
AnGap (mEq/L)	SG	14,15 ± 1,41 ^a	14,55 ± 2,16 ^a	13,85 ± 1,28 ^{ab}	13,81 ± 1,72 ^{ab}	12,7 ± 0,82 ^b	11,79 – 12,94 ¹
	CN	14,31 ± 1,75	14,15 ± 1,41	13,38 ± 1,45	13,71 ± 1,38	13 ± 2	
BUN (mg/dl)	SG	7 ± 5,76	8 ± 2,93	10,92 ± 6,69	8,8 ± 3,33	8,4 ± 3,2	7,8 - 10,2 ¹
	CN	6,69 ± 4,57 ^a	7 ± 5,76 ^{ab}	13,46 ± 6,83 ^{ab}	17 ± 14,94 ^b	10,25 ± 3,59 ^{ab}	
Na ⁺ (mEq/L)	SG	136,69 ± 2,39	135,18 ± 3,06	132,46 ± 7,58	131,45 ± 10,92	135,2 ± 4,61	136,61 - 137,65 ¹
	CN	135,62 ± 3,15 ^a	136,69 ± 2,39 ^{ab}	128 ± 7,76 ^b	127,43 ± 12,12 ^b	137,5 ± 2,87 ^a	
K ⁺ (mEq/L)	SG	4,59 ± 0,39	4,63 ± 0,37	4,7 ± 0,47	4,56 ± 0,92	4,49 ± 0,26	4,36 – 4,58 ¹
	CN	4,43 ± 0,29 ^a	4,59 ± 0,39 ^{ab}	4,85 ± 0,65 ^{ab}	5,09 ± 0,82 ^b	4,5 ± 0,61 ^{ab}	
Cl ⁻ (mEq/L)	SG	97,54 ± 2,18 ^A	97,55 ± 2,62	97,54 ± 6,23	96,91 ± 8,76	100,2 ± 2,9	98,36 – 99,82 ¹
	CN	94,84 ± 3,08 ^{Ba}	97,54 ± 2,18 ^{ab}	94,85 ± 5,76 ^a	94,43 ± 9,98 ^a	101 ± 1,41 ^b	
Glicose (mg/dL)	SG	90 ± 13,52	84,91 ± 13,22	87,92 ± 11,04	86,91 ± 17,45	89,1 ± 13,65	85,09 – 93,48 ¹
	CN	92,31 ± 14,94 ^{ab}	90 ± 13,52 ^{ab}	92 ± 12,57 ^{ab}	93,71 ± 17,21 ^a	77,75 ± 8,54 ^b	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas colunas diferem pelo teste T ($p < 0,05$) e minúsculas nas linhas diferem pelo teste Ducan ($p < 0,05$). ¹Níveis de referência de cordo com Freitas (2009).

Para avaliação dos parâmetros hemogasométricos deve-se considerar também uma análise do ponto de vista clínico por se tratarem de informações de relevância que influenciam diretamente a taxa de recuperação e sobrevivência dos animais. De acordo com os intervalos de referência descritos por Freitas (2009), a média do pH sanguíneo em ambos os grupos a partir do terceiro dia de diarreia ficaram abaixo dos valores de referência caracterizando o estado de acidemia, com maior intensidade no grupo CN. As médias obtidas para o íon HCO₃⁻, TCO₂ e BE se comportaram de forma semelhante com diminuição a níveis abaixo dos padrões fisiológicos a partir do primeiro dia de diarreia. Isso indica que os animais dos dois grupos estavam em acidose metabólica. Porém piores índices foram observados no grupo CN, no qual 69,23% (9/13) dos animais atingiram o limite pré-estabelecido de 9 mEq/L de Δ HCO₃⁻ e tiveram que receber fluidoterapia de suporte para auxiliar a recuperação clínica. Enquanto isso no grupo SG apenas 15,38% (2/13) dos animais necessitaram desse suporte terapêutico.

Os níveis da PCO_2 estavam abaixo dos valores de referência desde o início das observações e permaneceram estáveis no grupo SG até o quinto dia de diarreia, se elevando até os níveis de referência no sétimo dia. Enquanto isso, no grupo CN foi observada a redução mais acentuada da PCO_2 no primeiro e terceiro dia de diarreia.

Os valores de AnGap permaneceram acima dos níveis fisiológicos nos dois grupos em todos os momentos, com maior aumento no grupo SG, o que provavelmente está relacionado com as concentrações de lactato total que também permaneceram acima dos padrões em todos os momentos avaliados. Hiponatremia também foi observada em ambos os grupos desde o primeiro dia de diarreia, com maior intensidade no grupo CN. Houve também hipocloremia, hipercalemia e aumento do nitrogênio ureico do sangue com maior intensidade no grupo CN. A glicemia de ambos os grupos permaneceu dentro do intervalo de referência, exceto no sétimo dia de diarreia, quando a média do grupo CN estava em nível hipoglicêmico.

Na avaliação da bioquímica sérica foram observadas maiores médias nas concentrações de colesterol total no primeiro e quinto dia de diarreia no grupo SG em relação ao grupo CN ($p > 0,05$). Entre momentos, foi notado aumento significativo nas concentrações de colesterol apenas no sétimo dia de diarreia no grupo SG (tabela 4). No grupo SG, as concentrações de colesterol total se mantiveram dentro do intervalo de referência (Dirksen et al., 1993) em todos os momentos avaliados, enquanto no grupo CN as médias ficaram abaixo dos padrões no quinto e no sétimo dia de diarreia. Houve também maior concentração de ferro sérico nos bezerros do grupo SG no sétimo dia de diarreia em relação aos animais do grupo CN ($P = 0,021$). Não foram observadas variações na concentração de ferro entre momentos em ambos os grupos. As concentrações de ferro sérico no grupo SG se mantiveram em níveis fisiológicos (Dirksen et al., 1993) em todos os momentos avaliados. Por outro lado, no grupo CN as médias ficaram abaixo da normalidade para bezerros saudáveis no primeiro, terceiro e sétimo dia de diarreia.

Tabela 3: Média, desvio padrão e intervalos de referência de parâmetros de bioquímica sérica observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1º, 3º, 5º e 7º).

Item	Grupo	Basal	1º D	3º D	5º D	7º D	Referências
Proteína sérica (g/dL)	SG	5,59 ± 0,62 ^a	5,13 ± 0,5 ^b	5,01 ± 0,67 ^b	5,17 ± 0,44 ^{ab}	4,9 ± 0,34 ^b	5,9 – 7,0 ³
	CN	5,96 ± 0,58 ^a	5,38 ± 0,64 ^b	5,43 ± 0,74 ^b	5,37 ± 0,64 ^b	5,03 ± 0,34 ^b	
Albumina (g/dL)	SG	2,95 ± 0,32 ^a	3,44 ± 0,22 ^c	3,13 ± 0,27 ^{ab}	3,26 ± 0,23 ^{bc}	3,16 ± 0,21 ^{ab}	3,03 – 3,55 ²
	CN	2,91 ± 0,16 ^a	3,35 ± 0,19 ^c	3,21 ± 0,22 ^{bc}	3,35 ± 0,26 ^c	3,09 ± 0,2 ^b	
Globulina (g/dL)	SG	2,64 ± 0,52 ^a	1,69 ± 0,5 ^b	1,88 ± 0,52 ^b	1,91 ± 0,43 ^b	1,74 ± 0,4 ^b	3,0 – 4,0 ³
	CN	2,9 ± 0,77 ^a	2,02 ± 0,75 ^b	2,23 ± 0,66 ^b	2,02 ± 0,58 ^b	1,95 ± 0,29 ^b	
Ureia (mg/dL)	SG	17,57 ± 9,85	23,23 ± 6,38	26,97 ± 11,51	30,26 ± 30,62	26,76 ± 20,28	12,012 - 33,03 ³
	CN	17,39 ± 7,08	28,21 ± 13,12	30,76 ± 12,36	31,4 ± 21,32	31,87 ± 28,84	
Creatinina (mg/dL)	SG	1,19 ± 0,28	1,16 ± 0,23	1,32 ± 0,27	1,31 ± 0,59	1,08 ± 0,39	1,24 – 2,03 ³
	CN	1,08 ± 0,18	1,06 ± 0,17	1,23 ± 0,32	1,29 ± 0,65	1,27 ± 0,98	
Triglicérides (mg/dL)	SG	41,13 ± 21,07 ^a	24,73 ± 12,41 ^b	27,68 ± 18,28 ^b	22,42 ± 12,03 ^b	23,38 ± 10,49 ^b	15,04 – 45,13 ³
	CN	38,73 ± 23,72 ^a	21,75 ± 6,48 ^b	25,83 ± 14,67 ^b	19,48 ± 7,59 ^b	19,31 ± 5,85 ^b	
Colesterol (mg/dL)	SG	48,82 ± 11,41 ^a	64,96 ± 14,56 ^{Aab}	59,74 ± 17,1 ^{ab}	66,46 ± 25,66 ^{Aab}	72,11 ± 32,95 ^b	50,19 – 150,57 ³
	CN	55,88 ± 13,99	53,25 ± 12,51 ^B	51,01 ± 16,89	47,16 ± 20,55 ^B	49,49 ± 26,52	
Lactato (mmol/L)	SG	2,72 ± 1,07	3,38 ± 0,95	3,03 ± 1,61	2,76 ± 1,28	2,79 ± 1,01	1,72 – 2,10 ¹
	CN	2,57 ± 0,68	3,09 ± 1,21	3 ± 1,25	3,26 ± 2,09	2,44 ± 1,4	
LDH (U/L)	SG	869,95 ± 402,55 ^a	803,06 ± 223,11 ^{ab}	675,22 ± 318,3 ^{ab}	650,11 ± 166,5 ^{ab}	616,02 ± 187,01 ^b	500 - 1500 ³
	CN	823,36 ± 368,73 ^a	801,16 ± 213,04 ^{ab}	574,38 ± 206,3 ^b	736,41 ± 279,23 ^{ab}	738,79 ± 308,48 ^{ab}	
AST (U/L)	SG	37,5 ± 13,65 ^a	23,98 ± 5,11 ^b	21,6 ± 6,84 ^b	21,76 ± 3,52 ^b	22,51 ± 6,3 ^b	10 - 50 ³
	CN	34,57 ± 19,49 ^a	27,31 ± 17,75 ^{ab}	22,31 ± 7,464 ^b	27,73 ± 9,49 ^{ab}	26,89 ± 7,6 ^{ab}	
CK (U/L)	SG	71,78 ± 35,61 ^a	90,54 ± 53,04 ^{ab}	104,58 ± 51,73 ^{ab}	122,92 ± 52,8 ^{bc}	153,55 ± 63,3 ^c	20 - 100 ³
	CN	51,31 ± 28,57 ^a	62 ± 46,61 ^a	71,46 ± 26,06 ^a	112,85 ± 74,8 ^b	130,75 ± 64,55 ^b	
Cálcio (mg/dL)	SG	10,85 ± 0,84 ^a	9,53 ± 0,74 ^b	9,47 ± 1,43 ^b	9,31 ± 0,79 ^b	8,54 ± 0,67 ^c	7,2 – 10,0 ³
	CN	11,42 ± 0,67 ^a	9,54 ± 0,6 ^b	9,31 ± 1,09 ^{bc}	9 ± 0,68 ^{bc}	8,65 ± 0,82 ^c	
Fósforo (mg/dL)	SG	7,54 ± 0,97 ^a	8,09 ± 1,18 ^a	6,58 ± 0,69 ^b	6,76 ± 0,69 ^b	6,51 ± 1,12 ^b	6,19 – 10,84 ³
	CN	7,96 ± 0,76 ^a	7,8 ± 1,22 ^a	6,58 ± 1,2 ^b	6,66 ± 1,59 ^b	6,52 ± 1,72 ^b	
Magnésio (mg/dL)	SG	1,94 ± 0,17 ^a	2,12 ± 0,18 ^a	2,15 ± 0,17 ^b	2,75 ± 0,4 ^a	2,12 ± 0,2 ^a	1,22 – 2,92 ³
	CN	1,94 ± 0,2 ^a	2,09 ± 0,25 ^{ab}	2,2 ± 0,24 ^b	2,67 ± 0,34 ^c	2,02 ± 0,36 ^{ab}	
Ferro (mg/dL)	SG	86,98 ± 88,12	80,32 ± 51,88	80,24 ± 41,2	82,93 ± 39,47	76,37 ± 17,77 ^A	70 - 250 ³
	CN	91,82 ± 100,1	62,9 ± 17,88	63,34 ± 21,75	71,3 ± 37,97	56,87 ± 18,8 ^B	
Cobre (mg/dL)	SG	60,05 ± 21,18 ^a	78,2 ± 21,72 ^{ab}	73,97 ± 21,63 ^{ab}	82,16 ± 27,78 ^b	89,58 ± 25,81 ^b	50 - 250 ³
	CN	80,31 ± 35,55 ^a	84 ± 22,23 ^{ab}	85,89 ± 23,93 ^{ab}	103,57 ± 27,11 ^{ab}	106,98 ± 25,43 ^b	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas colunas diferem pelo teste T ($p < 0,05$) e minúsculas nas linhas diferem pelo teste Duncan ($p < 0,05$). Níveis de referência de cordo com ¹Freitas (2009); ²Kaneko et al., 2008; ³Dirksen et al., 1993.

Os demais parâmetros bioquímicos avaliados não sofreram influência significativa pelo aditivo na dieta e se comportaram de forma semelhante na comparação entre grupos e entre momentos. Contudo, de acordo com os padrões de referência observados em bovinos saudáveis (Dirksen et al., 1993; Kaneko et al., 2008), em média os bezerros aqui avaliados em ambos os grupos apresentaram hipoproteinemia e hipoglobulinemia porém com albumina dentro do intervalo fisiológico. As dosagens da enzima CK em ambos os grupos permaneceram acima dos intervalos de referência no quinto e sétimo dia de diarreia. Os outros parâmetros avaliados, creatinina, ureia, triglicérides, cálcio, fósforo, magnésio, cobre, AST e LDH, não sofreram variações clinicamente relevantes, permanecendo em níveis fisiológicos em todas as avaliações nos dois grupos.

No eritrograma, resultados semelhantes foram observados entre os grupos e variações entre momentos de cada grupo (tabela 5). Contudo, no leucograma foi registrada maior contagem de neutrófilos bastonetes no grupo CN durante o primeiro dia de diarreia ($p = 0,041$) e de leucócitos totais no terceiro dia de diarreia ($p = 0,029$). Houve redução significativa na contagem de neutrófilos bastonetes entre momentos a partir do primeiro dia de diarreia. O grupo CN também apresentou a mensuração de fibrinogênio plasmático significativamente maior no sétimo dia de diarreia ($p = 0,0099$) em relação ao grupo SG e sua concentração no momento basal. No grupo SG, houve aumento na concentração de fibrinogênio em relação ao nível basal no terceiro e quinto dia de diarreia. Além disso, o grupo SG, no momento basal, apresentou maior contagem de linfócitos ($p = 0,033$) e menor relação neutrófilo/linfócito ($p = 0,029$) que o grupo CN. Entre momentos a variação de linfócitos foi significativa no grupo SG apenas no primeiro dia de diarreia, enquanto no grupo CN essa um aumento significativo foi verificado do primeiro ao sétimo dia de diarreia.

Tabela 4: Média, desvio padrão e intervalos de referência de parâmetros hematológicos observados em bezerros experimentalmente inoculados com 1×10^6 oocistos de *C. parvum* no grupo SG (dieta suplementada com 5g BID do extrato padronizado de *M. cordata*) e CN (dieta controle, sem aditivos) nas avaliações realizadas no momento basal e dias de diarreia (1°, 3°, 5° e 7°).

Item	Grupo	Basal	1° D	3° D	5° D	7° D	Referências
Volume Globular (%)	SG	31,31 ± 5,85 ^{ab}	31,31 ± 5,57 ^{ab}	32,46 ± 5,32 ^a	31,85 ± 5,77 ^{ab}	31,31 ± 6,07 ^b	26 – 42 ¹
	CN	32,23 ± 7,35	33,08 ± 8,09	33,54 ± 7,01	33,69 ± 8,8	33,92 ± 8,62	
Hemácias (x10 ⁶ /μl)	SG	7,29 ± 1,3 ^a	7,73 ± 1,27 ^b	8,08 ± 1,28 ^b	8,04 ± 1,55 ^b	7,98 ± 1,44 ^b	5 – 8 ¹
	CN	8,05 ± 2,19 ^a	8,32 ± 2,34 ^a	8,59 ± 2,09 ^{bc}	8,81 ± 2,17 ^c	8,74 ± 2,17 ^{bc}	
Hemoglobina (g/dL)	SG	8,44 ± 1,97 ^a	8,66 ± 1,73 ^{ab}	9,35 ± 1,85 ^c	9,3 ± 2,01 ^{ab}	9,01 ± 1,97 ^{ab}	8 – 14 ¹
	CN	8,87 ± 2,58 ^a	9,03 ± 2,53 ^{ab}	9,43 ± 2,4 ^{ab}	9,56 ± 2,62 ^b	9,34 ± 2,76 ^{ab}	
VCM (fL)	SG	36,65 ± 4,28 ^a	34,75 ± 3,84 ^b	34,52 ± 3,82 ^c	33,9 ± 3,67 ^d	33,36 ± 3,3 ^e	37 – 54 ¹
	CN	36,69 ± 4,1 ^a	34,36 ± 3,37 ^a	33,82 ± 2,85 ^b	33,17 ± 2,99 ^c	32,57 ± 2,96 ^d	
CHCM (g/L)	SG	31,47 ± 1,25 ^a	32,34 ± 2,38 ^b	33,61 ± 1,86 ^{bc}	34,27 ± 2,07 ^c	33,86 ± 1,92 ^{bc}	26 - 36 ¹
	CN	30,33 ± 2,67 ^a	31,88 ± 2,18 ^{ab}	32,64 ± 2,23 ^b	32,89 ± 2,42 ^b	32,78 ± 2,22 ^b	
Leucócitos totais (x10 ³ /μl)	SG	8,08 ± 2,16 ^a	16,49 ± 5,21 ^c	12,48 ± 4,85 ^{Ab}	13,61 ± 3,93 ^{bc}	12,29 ± 3,28 ^b	4 – 12 ¹
	CN	8,52 ± 2,5 ^a	16,04 ± 4,09 ^b	17,63 ± 6,9 ^{Bb}	16,46 ± 4,2 ^b	13,85 ± 4,2 ^b	
Neutrófilos (x10 ³ /μl)	SG	4,05 ± 2,03 ^a	11,29 ± 5,07 ^{bc}	8,28 ± 5,07 ^{bc}	9,7 ± 4,2 ^c	8,35 ± 3,52 ^b	1,5 - 5 ¹
	CN	5,58 ± 2,26 ^a	10,78 ± 4,83 ^b	11,99 ± 6,35 ^b	12,17 ± 4,1 ^b	8,97 ± 4,56 ^b	
Linfócitos (x10 ³ /μl)	SG	2,97 ± 1,28 ^{Aa}	4,01 ± 1,37 ^b	3,05 ± 1,76 ^a	3,01 ± 1,04 ^a	3,15 ± 1,12 ^a	3,5 - 7,5 ¹
	CN	2,04 ± 1,28 ^{Ba}	4,15 ± 2,65 ^b	3,91 ± 1,52 ^b	2,94 ± 1,36 ^b	3,72 ± 2,47 ^b	
Neutrófilo:linfócito (x10 ³ /μl)	SG	1,64 ± 1,21 ^{Aa}	3,11 ± 1,9 ^{bc}	3,51 ± 2,31 ^{bc}	3,69 ± 2,07 ^c	3,39 ± 2,97 ^b	0,43 – 0,66 ¹
	CN	4,82 ± 5,18 ^B	3,96 ± 3,07	3,78 ± 2,98	5,29 ± 3,66	3,25 ± 2,26	
Monócitos (x10 ³ /μl)	SG	1 ± 0,46 ^{ab}	1,16 ± 0,45 ^{ab}	1,12 ± 0,36 ^b	0,89 ± 0,53 ^{ab}	0,78 ± 0,363 ^a	0,1 – 1,5 ¹
	CN	0,75 ± 0,44 ^a	1,05 ± 0,64 ^{ab}	1,62 ± 1,02 ^b	1,2 ± 0,59 ^{ab}	1,16 ± 0,79 ^b	
Eosinófilos (x10 ³ /μl)	SG	0,03 ± 0,07	0,03 ± 0,08	0,03 ± 0,07	0 ± 0	0,02 ± 0,05	0,1 – 1,5 ¹
	CN	0,07 ± 0,16 ^a	0,01 ± 0,03 ^b	0,01 ± 0,05 ^b	0,04 ± 0,1 ^{ab}	0 ± 0 ^b	
Basófilos (x10 ³ /μl)	SG	0,01 ± 0,02	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	Raros ¹
	CN	0,01 ± 0,04	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
Bastonetes (x10 ³ /μl)	SG	0,02 ± 0,07 ^a	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 - 0,12 ¹
	CN	0,08 ± 0,24	55,08 ± 87,99 ^B	97,54 ± 351,68	0,11 ± 0,24	0 ± 0	
Plaquetas (x10 ³ /μl)	SG	344,23 ± 84,72 ^a	710,17 ± 157,6 ^b	701 ± 201,17 ^b	659,67 ± 171,9 ^b	641,38 ± 186,23 ^b	175 - 620 ¹
	CN	327,42 ± 91,35 ^a	644,38 ± 226,8 ^c	586,3 ± 234,4 ^{bc}	629,77 ± 214,4 ^c	538,61 ± 128,08 ^b	
Proteína plasmática (g/dL)	SG	6,02 ± 0,63	6,14 ± 0,38	6,22 ± 0,53	6,14 ± 0,33	5,98 ± 0,34	6 – 8 ¹
	CN	6,11 ± 0,55	6,26 ± 0,51	6,46 ± 0,63	6,38 ± 0,69	6,17 ± 0,53	
Fibrinogênio (mg/dL)	SG	280 ± 339,4 ^{ab}	384,6 ± 310,5 ^{abc}	523,1 ± 208,8 ^c	507,7 ± 290 ^c	292,3 ± 132,1 ^{Aa}	200 – 500 ¹
	CN	261,54 ± 171,0 ^a	353,9 ± 233,2 ^{ab}	430,8 ± 314,6 ^{ab}	446,2 ± 317,9 ^{ab}	566,7 ± 305,5 ^{Bb}	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas colunas diferem pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney ($p < 0,05$) e minúsculas nas linhas diferem pelo teste Friedman ($p < 0,05$). Níveis de referência de cordo com ¹Harvey (2012).

DISCUSSÃO

Entre os agentes etiológicos causadores de diarreia em bezerros lactentes, *C. parvum* parece atuar com papel de destaque para a manifestação da doença. O desafio aqui utilizado foi capaz de reproduzir a doença de forma similar aos casos descritos de infecção natural e da mesma forma que os resultados de Carvalho et al. (2014), nesse trabalho *C. parvum* foi o patógeno mais frequente durante todos os dias de diarreia pesquisados.

Internacionalmente, rotavírus e coronavírus bovinos são os agentes virais mais associados à diarreia em bezerros (Mayameei et al., 2010; Lorenzetti et al., 2013; Ammar et al., 2014). Embora a presença de rotavírus não tenha sido registrada, a alta frequência de coronavírus nas amostras pesquisadas superaram as ocorrências mostradas em observações prévias no Brasil (Oliveira Filho et al., 2007; Lorenzetti et al., 2013; Coura et al., 2014; Alfieri et al., 2018). A infecção por coronavírus é mais comum em bezerros com menos de 30 dias de idade (Ammar et al., 2014) e apresenta um período de incubação de 24 a 48 horas (Valarcher e Hägglund, 2011), além de alta capacidade de dispersão em ambientes com alta densidade animal (Alfieri et al., 2018). No presente trabalho, alguns animais já eliminavam coronavírus nas fezes no dia do desafio com *C. parvum* (figura 8), dessa forma, a presença desses animais permanecendo no mesmo ambiente (galpão fechado) no qual os demais bezerros foram alocados, pode ter favorecido a amplificação e dispersão das partículas virais aos demais animais suscetíveis nos dias subsequentes.

Foram poucos os isolamentos de *Salmonella* e *E. coli* (ETEC), e suas frequências não diferiram entre os grupos. Entretanto foi possível observar que o diagnóstico de ETEC foi mais frequente entre os animais do grupo controle (figura 8). Há relatos na literatura que indicam a existência de atividade antimicrobiana nos alcaloides QBAs + PA encontrados no aditivo alimentar aqui utilizado (Croaker et al., 2016). Os mecanismos de ação de alguns desses alcaloides parecem inibir o crescimento bacteriano em vários pontos de replicação (Beuria et al., 2005; Obiang-Obounou et al., 2011). Estudos prévios também relacionam que a suplementação com QBAs+PA levou à diminuição da excreção fecal de *Salmonella* em suínos (Robins et al., 2013) e de *E. coli* em novilhos de corte (Moreno et al., 2015). Portanto, isso poderia explicar porque o isolamento de ETEC foi menos observado nas fezes dos animais suplementados, contudo outros estudos direcionados a esse tema devem ser conduzidos para entender melhor a questão.

Coinfecções entre patógenos foram observadas durante os dias de diarreia, nos quais a associação entre *C. parvum* e coronavírus foi o apontamento mais frequente. Esses resultados diferem de descrições anteriores que relacionam com maior frequência a combinação de *Cryptosporidium* e rotavírus (García et al., 2000; Gulliksen et al., 2009). Embora seja comum a identificação de coronavírus em fezes não diarreicas sob infecção assintomática (Oliveira Filho et al., 2007), aqui não foi possível determinar com precisão qual a influência de cada agente infeccioso encontrado para a manifestação da diarreia. Porém, a despeito de quais os patógenos envolvidos na diarreia, sabe-se que as coinfecções podem ser um fator determinante para a intensidade da doença (Reynolds et al., 1986).

Embora nesse trabalho não tenha sido identificado apenas um enteropatógeno com potencial de induzir a doença, os sinais clínicos da diarreia neonatal de bezerros tendem a ser semelhantes, independentemente do agente causador. Desse modo, a diarreia é acompanhada por desidratação, acidose metabólica com hiponatremia, hipercalemia e azotemia (Guzelbektes et al., 2006; Freitas, 2009) e menos frequentemente, hipocloremia, hipernatremia e balanço energético negativo com

ou sem hipoglicemia (Seifi et al., 2006; Tsukano et al., 2018). Dessa forma, nossos achados são compatíveis com a literatura em relação à desidratação, ao perfil ácido-base e eletrolítico observado na diarreia neonatal de bezerros em descrições prévias.

As diferenças entre os grupos observadas no momento basal para TCO_2 e cloreto parecem não relevantes em relação ao tratamento avaliado, pois essas variações poderiam ser decorrentes de oscilações no perfil ácido-base e eletrolítico comuns em bezerros saudáveis nos primeiros dias após o nascimento (Lisbôa et al., 2002, Freitas, 2009). Angelov et al. (1996) sugerem que os efeitos da acidose mista do período perinatal podem se estender até aproximadamente o terceiro ou quinto dia de idade.

A interpretação clínica do *status* ácido-base nos permite afirmar que a diarreia em ambos os grupos levou os animais ao quadro de acidose metabólica compensada sinalizada pela redução do pH, HCO_3^- , TCO_2 e PCO_2 (Freitas, 2009). O comportamento observado nesses parâmetros está estreitamente relacionado à grande perda de HCO_3^- nas fezes durante os episódios de diarreia (Naylor, 1999; Naylor et al., 2006; Guzelbektes et al., 2007). Além disso, vale ressaltar que os animais do grupo CN utilizaram mais intensamente de mecanismos compensatórios da acidose metabólica, como a redução de HCO_3^- , aumento da concentração de K^+ , a redução da PCO_2 e a redução do pH urinário. De acordo com Freitas (2009) a capacidade de utilizar esses mecanismos é o que determina a sobrevivência ou morte dos animais com diarreia. No entanto, em termos de prognóstico, observa-se que a hipercalemia e o aumento da PCO_2 são associados a bezerros diarreicos que não sobrevivem à doença (Seifi et al., 2006; Tsukano et al., 2018). Ademais, foram observados níveis mais elevados de BUN nos bezerros do grupo CN. Essa alteração é relacionada à diminuição da taxa de filtração glomerular em resposta a desidratação grave (Guzelbektes et al., 2006) e constituem outro fator de risco relacionado a diminuição da taxa de sobrevivência em até 5,6 vezes para aqueles animais com $\text{BUN} > 13,07$ mmol/L (Seifi et al., 2006). Portanto, o uso do aditivo alimentar com QBAs+PA possibilitou, frente ao desafio experimental imposto, um desequilíbrio ácido-base e eletrolítico de menor intensidade no grupo SG. Possivelmente isso está relacionado ao mecanismo anti-inflamatório dos alcaloides agindo localmente na mucosa intestinal (Chaturvedi et al., 1997; Sweeney et al., 2000; Niu et al., 2012). Em outras condições experimentais, o uso desse extrato vegetal em ratos Wistar com colite induzida minimizou as alterações histológicas na mucosa do cólon e a expressão de enzimas marcadoras de lesão intestinal aguda (COX-2 e mieloperoxidase) (Vrublova et al., 2010). Dessa forma, um mecanismo semelhante pode estar envolvido na ação dos QBAs+PA no intestino dos bezerros minimizando a resposta inflamatória, a secreção e a perda de eletrólitos nas fezes diarreicas, tornando assim a acidose metabólica menos intensa nos animais tratados.

Nos quadros de diarreia em bezerros são descritas também alterações no perfil de lipídeos do sangue, causando diminuição nas concentrações séricas de colesterol total em decorrência de enteropatias com perda de proteínas e/ou devido reações inflamatórias com produção de citocinas proinflamatórias como o $\text{TNF}\alpha$ ou $\text{IL-1}\beta$ (Carpentier et al., 2002; Nassaji e Ghorbani, 2012; Bozukluhan et al., 2017). Dessa forma, considerando as propriedades anti-inflamatórias dos alcaloides aqui testados, os bezerros suplementados poderiam apresentar concentrações de colesterol total mais altas em relação aos animais CN. Nossos resultados contrastam, possivelmente devido ao desafio experimental, com trabalhos que utilizaram outras espécies animais saudáveis, nos quais observaram diminuição na concentração de colesterol do sangue de aves, suínos e peixes quando alimentados com esse aditivo na dieta (Gudev et al., 2004; Imanpoor e Roohi, 2015; Bavarsadi et al., 2016).

Sabendo-se que os alcaloides fornecidos por via oral são capazes de modular o processo inflamatório no intestino dos animais (Vrublova et al., 2010; Pickler et al., 2013; Robins et al., 2013), a menor concentração de ferro observada no sétimo dia de diarreia no grupo CN pode estar relacionada à resposta inflamatória mais intensa nesses animais frente ao desafio. Uma vez que o processo inflamatório mediado pela interleucina-1, pode diminuir a concentração sérica de ferro, como um mecanismo de defesa ao reduzir a disponibilidade do ferro que constitui um importante fator para multiplicação das bactérias (Kaneko et al., 2008).

Além disso, reforçando os demais achados, em alguns momentos os bezerros do grupo SG apresentaram menor contagem de leucócitos totais, neutrófilos bastonetes e concentração de fibrinogênio em comparação com o grupo CN. Isso possivelmente está relacionado também ao caráter anti-inflamatório e imunomodulador do extrato vegetal contendo os QBAs+PA utilizado como aditivo no leite dos bezerros SG. É possível que o uso do aditivo melhore a ação de neutrófilos como foi demonstrado por Agarwal et al. (1991) em um estudo *in vitro* com neutrófilos humanos no qual o uso da sanguinarina melhorou a taxa de quimiotaxia, aderência e fagocitose dessas células em cultura. Dessa forma, no nosso estudo um menor número de células no sangue pode representar um recrutamento menor nos animais do grupo SG em função da presença de células inflamatórias mais eficientes agindo no foco inflamatório intestinal. Assim, esse resultado pode ser análogo ao que foi observado em ovelhas com ruminite e alimentadas com dietas suplementadas com QBAs+PA, onde o epitélio rumenal apresentou escores de infiltração de neutrófilos mais baixos (Estrada-Angulo et al., 2016). Outra hipótese que pode justificar o menor número de células inflamatórias no grupo SG, seria a maior taxa de apoptose dessas células, como foi demonstrado *in vitro* por Sweeney et al. (2000) utilizando a queleritrina em culturas de polimorfonucleares humanos.

Com relação ao maior número de linfócitos e a menor relação neutrófilo/linfócito no grupo SG, resultados semelhantes foram observados por Bavarsadi et al. (2016), que observaram aumento de linfócitos e redução da relação heterófilo/linfócito no sangue de galinhas poedeiras alimentadas com esse produto fitogênico. Esse efeito pode sinalizar a existência de uma resposta imunológica mais eficiente no grupo SG já no momento basal, o que pode ter relação com um menor estresse oxidativo sobre os linfócitos dos animais com dieta suplementada (Psotova et al., 2006; Bavarsadi et al., 2016).

CONCLUSÃO

O uso dos QBAs+PA encontrados no extrato vegetal padronizado fornecido na dosagem de 10g/dia na dieta de bezerros neonatos influenciou de forma benéfica alguns parâmetros clínicos e laboratoriais com amenização de distúrbios metabólicos durante os episódios de diarreia. Dessa forma, além de ser uma alternativa ao uso de antimicrobianos para o controle da diarreia em bezerros lactentes, é provável que resultados semelhantes sejam observados se essa estratégia for aplicada no campo nas condições de desafio naturalmente adquirido. Porém, mais estudos com esse viés são necessários para explorar aplicação clínica desses alcaloides em bovinos e outras espécies domésticas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado e à Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH pela parceria indispensável e apoio para realização de todo o projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABUDABOS, A. M.; ALYEMNI, A. H.; DAFALLA, Y. M.; et al. The effect of phytogenic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 23, p. 24151-24157, 2016.

AGARWAL, S.; REYNOLDS, M. A.; POU, S.; et al. The effect of sanguinarine on human peripheral blood neutrophil viability and functions. *Molecular Oral Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 51-61, 1991.

AGUILAR-HERNÁNDEZ, J. A.; URÍAS-ESTRADA, J. D.; LÓPEZ-SOTO, M. A.; et al. Evaluation of isoquinoline alkaloid supplementation levels on ruminal fermentation, characteristics of digestion, and microbial protein synthesis in steers fed a high-energy diet. *Journal of animal science*, v. 94, n. 1, p. 267-274, 2016.

ALFIERI, A. A.; RIBEIRO, J.; DE CARVALHO BALBO, L.; et al. Dairy calf rearing unit and infectious diseases: diarrhea outbreak by bovine coronavirus as a model for the dispersion of pathogenic microorganisms. *Tropical animal health and production*, v. 50, n. 8, p. 1937-1940, 2018.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990.

AMMAR, S. S. M.; MOKHTARIA, K.; TAHAR, B. B.; et al. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, v. 4, p. S318-S322, 2014.

ANGELOV, G.; ANGELOV, A.; SLAVOV, E.; et al. Age dynamics of acid-base balance and some biochemical indices in calves. *Veterinarski Arhiv*, v. 66, p. 173-180, 1996.

ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *The Journal of parasitology*, v. 73, n. 2, p. 314-319, 1987.

ASANO, K. M.; DE SOUZA, S. P.; DE BARROS, I. N.; et al. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. *Journal of virological methods*, v. 169, n. 2, p. 375-379, 2010.

BAVARSAZI, M.; MAHDAVI, A. H.; ANSARI-MAHYARI, S. et al. Effects of different levels of sanguinarine on antioxidant indices, immunological responses, ileal microbial counts and

jejunal morphology of laying hens fed diets with different levels of crude protein. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 2016.

BELLINO, C. F.; ARNAUDO, C.; BIOLATTI, A. et al. Development of a diagnostic diagram for rapid field assessment of acidosis severity in diarrheic calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 240, n. 3, p. 312-316, 2012.

BEURIA, T. K.; SANTRA, M. K.; PANDA, D. Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, v. 44, n. 50, p. 16584-16593, 2005.

BISCHOFF, K. M., CALLAWAY, T. R., EDRINGTON, T. S.; et al. Antimicrobial use in food animals: Potential alternatives. *Encyclopedia of Animal Science; Pond, WS, Bell, AW, Eds*, p. 45-47, 2005.

BLANK, R.; MÜLLER-SIEGWARDT, B.; WOLFFRAM, S. Sanguinarine does not influence availability or metabolism of tryptophan in pigs. *Livestock Science*, v. 134, n. 1, p. 24-26, 2010.

BOZUKLUHAN, K.; MERHAN, O.; GOKCE, H. I.; et al. Alterations in lipid profile in neonatal calves affected by diarrhea. *Veterinary world*, v. 10, n. 7, p. 786, 2017.

CARPENTIER, Y. A.; SCRUEL, O. Changes in the concentration and composition of plasma lipoproteins during the acute phase response. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 5, n. 2, p. 153-158, 2002.

CARVALHO, J. G.; CARVALHO, A. U.; HEINEMANN, M. B.; et al. Longitudinal study of infection by enteropathogens in newborn calves with diarrhea under different feeding strategies. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 6, p. 529-536, 2014.

CARVALHO, J. G. *Produção de ige anti-Cryptosporidium parvum e estudo do comportamento da resposta humoral de bezerros com criptosporidiose induzida*. 2017. 89 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M. et al. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, p. 1-16, 2017.

CHATURVEDI, M. M.; KUMAR, A.; DARNAY, B. G.; et al. Sanguinarine (pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 48, p. 30129-30134, 1997.

COURA, F. M., FREITAS, M. D., RIBEIRO, J. et al. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Tropical animal health and production*, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2015.

CROAKER, A.; KING, G. J.; PYNE, J. H.; et al. *Sanguinaria canadensis*: Traditional Medicine, Phytochemical Composition, Biological Activities and Current Uses. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 9, p. 1414, 2016.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. *Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos*. 3^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1993, 419p.

DVOŘÁK, Z.; VRZAL, R.; MAUREL, P.; et al. Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF- κ B in HeLa cells. *Chemico-biological interactions*, v. 159, n. 2, p. 117-128, 2006.

ESTRADA-ANGULO, A.; AGUILAR-HERNÁNDEZ, A.; OSUNA-PÉREZ, M.; et al. Influence of Quaternary Benzophenanthridine and Protopine Alkaloids on Growth Performance, Dietary Energy, Carcass Traits, Visceral Mass, and Rumen Health in Finishing Ewes under Conditions of Severe Temperature-humidity Index. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, v. 29, n. 5, p. 652, 2016

EUROPEAN UNION. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect (1831/2003/ec) Regulation Brussels, Belgium, 2005. .

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 25, n. 1, p. 13-36, 2009.

FRANCK, S. M.; BOSWORTH, B. T.; MOON, H. W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 1795–1797, 1998.

FREITAS, M.D. *Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais de bezerras com diarreia neonatal naturalmente adquiridas*. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

GARCIA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; ORDEN, J. A. et al. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 23, n. 3, p. 175-183, 2000.

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D. A. *Diagnostic medical parasitology*. 2. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 24, n. 1, p. 19-39, 2008.

GOOKIN, J. L.; NORDONE, S. K.; ARGENZIO, R. A. Host responses to *Cryptosporidium* infection. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 16, n. 1, p. 12-21, 2002.

GUDEV, D.; POPOVA-RALCHEVA, S.; MONEVA, P.; et al. Effect of supplemental Sangrovit on some biochemical indices and leukocytes phagocytic activity in growing pigs. *Archiva Zootechnica*, v. 7, p. 16-26, 2004.

GULLIKSEN, S. M.; JOR, E.; LIE, K. I.; et al. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of dairy science*, v. 92, n. 10, p. 5057-5066, 2009.

GUZELBEKTES, H.; COSKUN, A.; SEN, I. Relationship between the degree of dehydration and the balance of acid-based changes in dehydrated calves with diarrhoea. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, v. 51, n. 1, p. 83, 2007.

HARVEY, J. W. *Veterinary Hematology: A diagnostic guide and color Atlas*. Editora Elsevier. 2012. 368p.

IMANPOOR, M. R.; ROOHI, Z. Effects of Sangrovit-supplemented diet on growth performance, blood biochemical parameters, survival and stress resistance to salinity in the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Aquaculture Research*, 2015.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6. ed. Burlington: Academic Press, 2008.

KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for Salmonella detection. *Lett Appl Microbiol*, v. 22, n. 1, p. 46-51, 1996.

LANGONI H.; LINHARES A.C.; AVILA F.A.; et al. Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerras de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* n. 41, p. 313-319, 2004.

LEE, K. W.; KIM, J. S.; OH, S. T.; et al. Effects of dietary sanguinarine on growth performance, relative organ weight, cecal microflora, serum cholesterol level and meat quality in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2015.

LISBÔA, J. A. N.; BENESI, F. J.; do RÊGO LEAL, M. L; et al. Efeito da idade sobre o equilíbrio ácido-básico de bezerras sadias no primeiro mês de vida. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 3, p. 136-142, 2002.

LIU, G.; GUAN, G.; FANG, J.; et al. *Macleaya cordata* extract decreased diarrhea score and enhanced intestinal barrier function in growing piglets. *BioMed Research International*, v. 2016, 2016.

LORENZETTI, E.; DE ARRUDA LEME, R.; RIBEIRO, J.; et al. Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 2, 2013.

MAYAMEEI, A.; MOHAMMADI, G.; YAVARI, S.; et al. Evaluation of relationship between *Rotavirus* and *Coronavirus* infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comparative Clinical Pathology*, v. 19, n. 6, p. 553-557, 2010.

MCDANIELS, A. E.; RICE, E. W.; REYES, A. L.; et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 9, p. 3350–3354, 1996.

MORENO, L. E. S.; CRUZ, R. B.; RUBIO, J. A. R. et al. Influencia de la adición de extracto de *Macleaya cordata* en la presencia de *Escherichia coli* en bovinos de engorda. In: *XIV Seminário de avances de investigación - Programa de maestría en ciencias agropecuarias*, 2015. p. 19-30.

- NAKAGAWA, M.; SUZUKI, K.; TAGUCHI, K. Relationship between depression score and acid-base status in Japanese Black calves with diarrhea. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, v. 69, n. 5, p. 549–52, 2007.
- NASSAJI, M.; GHORBANI, R. Plasma lipid levels in patients with acute bacterial infections. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 42, n. 3, p. 465-469, 2012.
- NAYLOR, J. M. A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 30, n. 7, p. 577, 1989.
- NAYLOR, J. M. Oral electrolyte therapy. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.*, v.15, n.3, p. 487-504, 1999.
- NAYLOR, J.M. et al. Advances in oral and intravenous fluid therapy of calves with gastrointestinal disease. In: WORD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice, Paris. Anais. Nice: Société Française de Buiatrie, 2006. p.139-150.
- NIU, X.; FAN, T.; LI, W.; et al. The anti-inflammatory effects of sanguinarine and its modulation of inflammatory mediators from peritoneal macrophages. *European journal of pharmacology*, v. 689, n. 1, p. 262-269, 2012.
- OBIANG-OBOUNOU, B. W.; KANG, O. H.; CHOI, J. G.; et al. The mechanism of action of sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of toxicological sciences*, v. 36, n. 3, p. 277-283, 2011b.
- OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P.; PACHECO, M. D.; et al. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.
- PICKLER, L.; BEIRÃO, B. C.; HAYASHI, R. M.; et al. Effect of sanguinarine in drinking water on Salmonella control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 22, n. 3, p. 430-438, 2013.
- PSOTOVA, J.; VECERA, R.; ZDARILOVA, A.; et al. Safety assessment of sanguiritrin, alkaloid fraction of *Macleaya cordata*, in rats. *Veterinarni medicina-praha-*, v. 51, n. 4, p. 145, 2006.
- RAIRAT, T.; CHUCHIRD, N.; LIMSUWAN, C. Effect sangrovit WS on growth, survival and prevention of *Vibrio harveyi* in rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, v. 37, n. 1, p. 19-29, 2013.
- RAMOS, C. P.; XAVIER, R. G. C.; LEAL, C. A. G. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Salmonella* serovar Ndolo isolated from outbreaks in cattle and horses. *Ciência Rural*. Accepted for publication, 2018.
- RAWLING, M. D.; MERRIFIELD, D. L.; DAVIES, S. J. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture*, v. 294, n. 1, p. 118-122, 2009.

- REYNOLDS, D. J.; MORGAN, J. H.; CHANTER, N.; et al. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Veterinary Record*, v. 119, n. 2, p. 34-39, 1986.
- RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the United States Army medical department*, v. 8, n. 4, 1948.
- ROBBINS, R. C.; ARTUSO-PONTE, V. C.; MOESER, A. J.; et al. Effects of quaternary benzo (c) phenanthridine alkaloids on growth performance, shedding of organisms, and gastrointestinal tract integrity in pigs inoculated with multidrug-resistant *Salmonella* spp. *American journal of veterinary research*, v. 74, n. 12, p. 1530-1535, 2013.
- SEIFI, H. A.; MOHRI, M.; SHOOREI, E.; et al. Using haematological and serum biochemical findings as prognostic indicators in calf diarrhoea. *Comparative Clinical Pathology*, v. 15, n. 3, p. 143-147, 2006.
- SNODGRASS, D. R., TERZOLO, H. R., SHERWOOD, D. et al. Aetiology of diarrhoea in young calves. *The Veterinary Record*, v. 119, n. 2, p. 31-34, 1986.
- SWEENEY, J. F.; NGUYEN, P. K.; ATKINS, K. B.; et al. Chelerythrine chloride induces rapid polymorphonuclear leukocyte apoptosis through activation of caspase-3. *Shock*, v. 13, n. 6, p. 464-471, 2000.
- THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; et al. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley & Sons, 2nd Ed., 2012., 776p.
- TSUKANO, K.; SARASHINA, S.; SUZUKI, K. Hypoglycemia and failure of respiratory compensation are risk factors for mortality in diarrheic calves in Hokkaido, northern Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 80, n. 7, p. 1159-1164, 2018.
- VALARCHER, J.; HÄGGLUND, S. Bovine coronavirus. In: LEFEVRE, P. C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R.; et al. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. CABI, 2011. p. 545-552.
- VIEIRA, S. L.; BERRES, J.; REIS, R. N.; et al. Studies with sanguinarine like alkaloids as feed additive in broiler diets. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 10, n. 1, p. 67-71, 2008.
- VRUBLOVA, E.; VOSTALOVA, J.; EHRMANN, J.; et al. The phytogenic feed additive Sangrovit modulates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Veterinarni Medicina*, v. 55, n. 12, p. 610-618, 2010.
- XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999.
- ZHAO, L.; MATULKA, R. A.; VON ALVENSLEBEN, S.; et al. Residue study for a standardized *Macleaya cordata* extract in growing-finishing swine. *Open Journal of Animal Sciences*, v. 7, n. 2, p. 93, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação em dose única, por via oral de 1×10^6 oocistos de *C. parvum* se mostrou um método eficiente para a indução experimental da doença em bezerros neonatos.

A estratégia de suplementação dietética com 5g do extrato vegetal padronizado (Sangrovit® CS) fornecido BID juntamente com ao leite durante os primeiros 21 dias de vida foi eficaz na atenuação da diarreia

Embora os alcaloides isoquinolínicos contidos no extrato vegetal padronizado não tenham ação direta sobre *C. parvum*, seus mecanismos antiinflamatórios e antioxidantes influenciaram positivamente para que a manifestação da doença fosse mais branda, com menor necessidade de fluidoterapia, bem como a recuperação mais precoce e menores prejuízos na vida produtiva dos animais.

Apesar dos inúmeros esforços com medidas de biossegurança e desinfecção para manter os animais experimentais em um ambiente livre de outros patógenos potencialmente causadores de diarreia não foi possível impedir infecções por outros agentes que se associaram ao patógeno inoculado no desafio experimental. Contudo, vale ressaltar que todos os animais foram submetidos as mesmas condições ambientais e portanto a mesma carga infectante proveniente do ambiente.

Independentemente das infecções associadas ao *C. parvum* o uso do extrato vegetal padronizado influenciou de forma benéfica os parâmetros clínicos e laboratoriais durante os episódios de diarreia.

O extrato vegetal padronizado (Sangrovit® CS) pode ser uma alternativa sustentável e natural ao uso de antimicrobianos para o controle da diarreia em bezerros lactentes.

São necessários mais estudos avaliando essa estratégia em condições de campo com desafio naturalmente adquirido.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA- UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG)

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p style="text-align: center;">CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>UFMG</p>	
<p>CERTIFICADO</p> <p>Certificamos que o Protocolo nº. 279 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do Sangrovit® CS no controle da diarreia em bezerros neonatos", que tem como responsável ELIAS JORGE FACURY FILHO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/11/2015. Este certificado expira-se em 24/11/2020.</p>	
<p>CERTIFICATE</p> <p>We hereby certify that the Protocol nº. 279 / 2015, related to the Project entitled "Evaluation of sangrovit in control of diarrhea in newborn calves", under the supervision of ELIAS JORGE FACURY FILHO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/11/2015. This certificate expires in 24/11/2020.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 24/11/2015.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
	<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>

Anexo 2: Caracterização das fezes utilizada para estabelecer os escores de consistência fecal de bezerros neonatos desafiados experimentalmente com *C. parvum* no 3º dia de vida.

Escore	Descrição	Imagem
0	Fezes normais	
1	Fezes pastosas	
2	Diarreia leve, fezes aquosas	
3	Diarreia grave, fezes completamente líquidas	
4	Diarreia grave, fezes completamente líquidas e com presença de sangue	