

ANEXO I - PROJETO SIMPLIFICADO / PLANO DE TRABALHO

CONTRATO DE COMODATO

I – DADOS CADASTRAIS DO PROJETO

1. TÍTULO DO PROJETO

Controle de Doenças e Sustentabilidade na Bovinocultura: Resposta Imunológica Após Vacinação Contra Brucelose e Impacto da Mistura De Leguminosas ou N-Mineral em Pastagens de Minas Gerais

2. ÓRGÃO EXECUTOR

Departamento de Zootecnia

3. ÁREA DE ABRANGÊNCIA

- | | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa | <input type="checkbox"/> Inovação Tecnológica |
| <input type="checkbox"/> Extensão | <input type="checkbox"/> Extensão Tecnológica |
| <input type="checkbox"/> Ensino | <input type="checkbox"/> Desenvolvimento Institucional |

4. RESUMO DO PROJETO

Este projeto de pesquisa tem por objetivos, elucidar os mecanismos envolvidos na resposta imune inata após vacinação de bezerros contra a brucelose e a ativação da resposta adaptativa, tanto induzida pelas cepas B19 e RB51, mas também por uma cepa vacinal alternativa. Outro objetivo deste projeto é determinar o potencial de uso do feijão guandu seja em uma pastagem de Braquiária ou em uma pastagem mista de Braquiária e amendoim forrageiro, em relação ao uso de N-adubo ou não. O experimento será dividido em duas fases, na primeira fase os animais serão vacinados com as vacinas S19, RB51, cepa alternativa e solução salina estéril (NaCl 0,85%), as avaliações serão feitas por meio de definição de perfil de resposta imune celular (imunofenotipagem por citometria de fluxo) e quantificação de produção de citocinas *in vitro* após cultivo de sangue total. Na segunda fase do experimento os animais serão realocados e distribuídos em um delineamento em blocos casualizados com cinco tratamentos e três repetições. Os tratamentos serão: 1) Braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) sem adubação nitrogenada, 2) Consórcio de Braquiária com *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro), 3) Consórcio de Braquiária com *Cajanus cajan* (feijão guandu), semeando

no início do diferimento 4) Consórcio de Braquiária com amendoim forrageiro e feijão guandu, 5) Braquiária adubada com 150 kg ha-1ano-1 de N. Serão utilizadas 15 unidades experimentais (piquete 0,6 ha). Todos os tratamentos serão manejados com método de lotação contínua com taxa de lotação variável. Os animais a serem utilizados serão novilhas da raça Nelore. Ainda na segunda fase serão realizadas periodicamente avaliações de massa de forragem, acúmulo de forragem, valor nutritivo, consumo de forragem, ciclagem de nutrientes via serrapilheira e excretas, metano entérico e desempenho por animal e por área. Espera-se que essa estratégia promova um aumento significativo na fixação de nitrogênio no solo, contribuindo para a fertilidade e a saúde do ecossistema e menor emissão de metano entérico nos sistemas consorciados.

II – DESCRIÇÃO DO PROJETO

5. INTRODUÇÃO

O agronegócio é uma das atividades mais importantes no Brasil, tendo grande impacto econômico e social, garantindo emprego e renda para milhões de famílias envolvidas direta e indiretamente com o setor. Entre as atividades agropecuárias, a bovinocultura se destaca, uma vez que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina e o quarto de leite (FAO, 2022). Além do impacto econômico e social, a bovinocultura também é extremamente relevante do ponto de vista de saúde, uma vez que a proteína de origem bovina (carne ou leite) tem papel fundamental na manutenção da segurança alimentar no Brasil e no mundo.

A garantia da segurança alimentar passa tanto pela produção de alimentos em quantidade suficiente para uma população cada vez mais crescente, como também em produzir alimentos seguros e saudáveis, com valor nutricional adequado e livre de patógenos causadores de doenças para os seres humanos. Além disso, existe a preocupação com a forma em que este alimento é produzido, buscando sempre a sustentabilidade e o bem-estar animal. Neste sentido, projetos que visem o aumento da produtividade e a segurança dos alimentos, por meio de estratégias de nutrição e controle de doenças infecciosas nos rebanhos, e a diminuição do impacto ambiental são fundamentais para manter a relevância mundial da bovinocultura brasileira.

Entre as doenças que causam maior impacto econômico para a bovinocultura, a brucelose se destaca, causando grandes perdas produtivas e reprodutivas (abortos e crias fracas), além de impactar diretamente a segurança alimentar, visto que é uma zoonose, podendo ser transmitida aos seres humanos por meio do consumo de leite e produtos lácteos. A doença é causada por bactérias do gênero *Brucella*, sendo a *B. abortus* a espécie mais prevalente em bovinos (Pappas et al., 2005). O controle da doença se dá principalmente pelo abate de animais positivos e a vacinação obrigatória das fêmeas jovens (entre 3 e 8 meses), com as cepas vacinais B19 e RB51, ambas eficazes na prevenção do aborto e da infecção, além de oferecerem proteção duradoura (Oliveira et al. 2021).

Contudo, apesar de essas vacinas já virem sendo utilizadas há décadas para prevenção da doença em

vários países, os mecanismos pelos quais a resposta imune do animal é desencadeada após vacinação e, principalmente, quais os mecanismos inatos envolvidos na ativação da resposta imune adaptativa e memória imune, ainda não estão completamente elucidados. Além disso, as cepas B19 e RB51 possuem limitações do ponto de vista prático, como a não diferenciação de animais vacinados ou infectados, no caso da B19, ou a resistência a rifampicina, no caso da cepa RB51. Diante dessas limitações, além de entender melhor os mecanismos da resposta imune desencadeados por essas duas cepas vacinais, é fundamental testar e propor cepas alternativas. Neste sentido, este projeto visa elucidar os mecanismos envolvidos na resposta imune inata logo após vacinação e a ativação da resposta adaptativa, induzida pelas cepas B19 e RB51, mas também por uma cepa vacinal alternativa, comparando-a às cepas tradicionais. Além disso, deve-se avaliar a virulência residual desta cepa alternativa em bovinos, também em comparação com as cepas atualmente utilizadas como vacinas.

Como mencionado anteriormente, além do controle de doenças nos rebanhos, a bovinocultura deve se preocupar também com o aumento da produtividade e a produção sustentáveis. Neste sentido, as leguminosas forrageiras são capazes de suprir as necessidades de N do solo, associando-se aos microrganismos do solo para transformar o N₂ atmosférico em compostos de N utilizáveis pelas plantas. Além disso, o consórcio entre gramínea e leguminosa, gera um efeito aumentando as taxas de decomposição da serapilheira, onde a inclusão de 50% de leguminosa no sistema pode reduzir a imobilização de N, resultando no aumento da ciclagem total de nutrientes (Siqueira da Silva et al., 2012). Apesar de existirem diversos trabalhos avaliando os efeitos do consórcio gramínea-leguminosa na formação da pastagem (Ziech et al., 2015; Dubeux et al., 2017; Terra et al., 2019), muitas das possíveis combinações de gramíneas e leguminosas não foram avaliadas. De acordo com Barcellos et al. (2008), essas combinações podem resultar em melhorias no suprimento de quantidade e qualidade do pasto ao longo do ano e na recuperação de áreas degradadas.

A utilização de estratégias de manejo do pastejo como altura do dossel, por exemplo, tem se tornado um requisito essencial em pastagens com entrada de N (Rouquette Jr., 2015), fornecendo condições para melhores ajustes na estrutura do dossel para o pastejo (Congio et al., 2018). A entrada de nitrogênio em sistemas de pastagem pode alterar a morfologia das forrageiras devido ao aumento de sua taxa de crescimento. Mas, ajustes na taxa de lotação podem resultar em estruturas de dossel semelhantes, mesmo com diferentes entradas de N. No entanto, quase nenhuma informação está disponível sobre a estrutura do dossel de pastagens tropicais fertilizadas e mistas quando comparadas com sistemas não fertilizados com N sob as mesmas metas de manejo de pastagem (Homem et al., 2021).

Outro fator importantíssimo é a produção de metano, uma consequência necessária da digestão da forragem. Tornando crescente pela busca de estratégias para mitigar o CH₄ entérico produzido por ruminantes, principalmente por razões ambientais e pelo potencial de minimizar as perdas de energia pelo animal, levando a maiores ganhos. Portanto, para reduzir a pegada de carbono na produção de gado de corte, uma estratégia eficaz seria aumentar a produção por unidade de carbono emitido (Capper, 2011).

A alimentação a base de forragens, especialmente espécies de leguminosas forrageiras, representa uma

estratégia interessante para fornecer nitrogênio ao animal e diminuir as emissões de CH₄, aumentando a produtividade animal e mitigando as mudanças climáticas (CH₄, N₂O e emissões de amônia; Makkar, 2003; Reed, 1995). Leguminosas forrageiras contendo taninos condensados, mostraram reduzir a degradação de proteínas no rúmen in vitro (Makkar, 2003) e os ruminantes parecem capturar essas proteínas de forma mais eficiente.

Portanto, a aplicação de N ou introdução de uma leguminosa na ciclagem de N é essencial para se obter sistemas de pastagem produtivos e sustentáveis. Leguminosas forrageiras usadas em sistemas ruminantes podem diminuir as emissões de GEE devido ao menor uso de fertilizantes N e produção de fertilizantes, aumento da biodiversidade e diminuição do parasitismo em ruminantes.

Assim, leguminosas forrageiras podem ser ambiental e economicamente benéficas para diversos sistemas de produção e, diante disso, este projeto visa também determinar o potencial de uso de leguminosas associadas ou não, em pastagens de gramínea sobre a produtividade animal e emissões de gases de efeito estufa.

Referências

AOAC International. Salmonella in selected foods—immunoconcentration Salmonella (ICS) and enzyme-linked immunofluorescent assay (EFLA) screening method. AOAC official method 2001.09. Official methods of analysis, 17th ed, 2000. 20

AOAC. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 1990.

Barthram, G. T. Hill Farming Research Organisation, Biennial Report 1984–1985.

Capper, Judith L. The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007. Journal of animal science, v. 89, n. 12, p. 4249-4261, 2011.

Chen, Xubin B.; Gomes, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. 1992.

Congio, Guilherme FS et al. Strategic grazing management towards sustainable intensification at tropical pasture-based dairy systems. Science of the total environment, v. 636, p. 872-880, 2018.

de Oliveira MM, Pereira CR, de Oliveira IRC, Godfroid J, Lage AP, Dorneles EMS. Efficacy of Brucella abortus S19 and RB51 vaccine strains: A systematic review and meta-analysis. Transbound Emerg Dis. 2022 Jul;69(4):e32-e51. doi: 10.1111/tbed.14259

Dorneles, E., L. Oliveira, and A. Lage, 2017: Brucella Abortus Vaccines: Use in Control Programs and Immune Response. J. Bacteriol. Mycol. 4, 1–6, DOI: 10.26420/jbacteriolmycol.2017.1044

Dubeux JR, José CB et al. Biological N₂ fixation, belowground responses, and forage potential of rhizoma peanut cultivars. *Crop Science*, v. 57, n. 2, p. 1027-1038, 2017.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistical Database. [Rome] :FAO, 2022.

Georing, H. K. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Application). *Agriculture handbook*, v. 379, p. 1-20, 1970.

Haisan, J. et al. The effects of feeding 3-nitrooxypropanol on methane emissions and productivity of Holstein cows in mid lactation. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 5, p. 3110-3119, 2014.

Homem, Bruno GC et al. Palisadegrass pastures with or without nitrogen or mixed with forage peanut grazed to a similar target canopy height. 1. Effects on herbage mass, canopy structure and forage nutritive value. *Grass and Forage Science*, 2021b.

Huhtanen, Pekka; Kaustell, Kaisa; Jaakkola, Seija. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Animal Feed Science and Technology*, v. 48, n. 3-4, p. 211-227, 1994.

Makkar, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, v. 49, n. 3, p. 241-256, 2003.

Okito, A. et al. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36, n. 7, p. 1179-1190, 2004.

Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E., 2005. Brucellosis. *The New England journal of medicine* 352, 2325-2336.

Rezende, C. d P. et al. Litter deposition and disappearance in *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. *Nutrient cycling in Agroecosystems*, v. 54, n. 2, p. 99-112, 1999.

Rouquette JR, Francis M. Grazing systems research and impact of stocking strategies on pasture–animal production efficiencies. *Crop Science*, v. 55, n. 6, p. 2513-2530, 2015.

Shearer, Georgia; Kohl, Daniel H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Functional Plant Biology*, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986.

Siqueira Da Silva, Hiran Marcelo et al. Signal grass litter decomposition rate increases with inclusion of calopo. *Crop science*, v. 52, n. 3, p. 1416-1423, 2012.

Terra, Ana Beatriz C. et al. Leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens no Brasil. *Revista de*

Ciências Agrárias, v. 42, n. 2, p. 11-20, 2019.

Titgemeyer, E. C. et al. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, v. 79, n. 4, p. 1059-1063, 2001.

Ziech, Ana Regina Dahlem et al. Proteção do solo por plantas de cobertura de ciclo hibernar na região Sul do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, p. 374-382, 2015.

6. OBJETIVO GERAL

Portanto, este projeto visa (1) caracterizar e comparar a resposta imunológica induzida pela vacinação contra brucelose com B19, RB51 e uma cepa alternativa em bovinos, com foco nos mecanismos efetores da resposta inata envolvidos na ativação da resposta adaptativa, além de comparar a virulência residual em bovinos da cepa alternativa em relação às cepas clássicas; (2) determinar o potencial de uso de leguminosas associadas ou não, em pastagens de gramínea sobre a produtividade animal e emissões de gases de efeito estufa.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Vacinação de bezerras bovinas com B19, RB51 e uma cepa vacinal alternativa e avaliar e comparar:
 - a) a expressão in vitro de citocinas (TNF- α e IFN- γ) por leucócitos mononucleares sanguíneos (CD4+, CD8+ e CD14+) por meio de ensaios de marcação intracelular seguidos de citometria de fluxo;
 - b) a atividade efetora (expressão de granzima B e perforina) de linfócitos T CD8+ por meio de ensaios de marcação intracelular seguidos de citometria de fluxo;
 - c) a expressão de fenótipos de ativação celular (CD28+, CD80+ e CD86+) em leucócitos mononucleares sanguíneos (CD4+, CD8+ e CD14+), através de ensaios de imunofenotipagem em cultura de sangue total seguidos de citometria de fluxo;
 - d) a proporção de células de memória (CD45RO+) em subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) por meio de ensaios de imunofenotipagem em cultura de sangue total seguida de citometria de fluxo;
 - e) a capacidade fagocítica de monócitos (CD14+) e Natural Killers (CD335) do sistema fagocitário através de cultura de sangue total seguida de citometria de fluxo;
 - f) o acúmulo de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6 e IL-4) no sobrenadante da cultura de sangue total por meio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*),
 - g) a virulência residual por meio de punção de linfonodo cervical superficial e quantificação de microrganismos no aspirado, por meio de diluição sérica e plaqueamento e qPCR.
2. Animais em pastagens de leguminosas associadas ou não com gramíneas:
 - a) quantificar o aumento de produção de forragem com uso de N-Adubo ou uso de leguminosas em pastagens;
 - b) quantificar o consumo de forragem, taxa de lotação e ganho de peso animal com uso de N-Adubo ou

- uso de leguminosas em pastagens;
- c) quantificar a fixação biológica de nitrogênio de duas leguminosas associadas ou não em pastos consorciados;
 - d) quantificar a ciclagem de nitrogênio em diferentes pastagens;
 - e) definir potencial de mitigação de metano entérico de animais em pastos consorciados em diferentes épocas do ano.

8. JUSTIFICATIVA

A utilização de animais provenientes de fora da UFLA para a realização desta pesquisa é necessária devido à composição restrita do rebanho do Setor de Bovinocultura de Corte da universidade. Este rebanho é composto por vacas de cria, bezerros e alguns animais em fase de recria. Manter um rebanho extenso de animais próximos à fase de terminação exigiria uma grande área e acarretaria custos elevados, o que não é viável dentro das condições disponíveis e dos princípios de economicidade aplicáveis ao setor público. Portanto, para atender às necessidades específicas deste projeto de pesquisa, é imprescindível estabelecer um contrato de comodato para a utilização de animais provenientes de fontes externas à UFLA.

A importância da realização deste projeto de pesquisa para a UFLA é justificada pela formação de recursos humanos, gerando duas teses de Doutorado e uma Dissertação de Mestrado vinculados aos Programas de Pós-Graduação em Zootecnia e em Ciências Veterinárias da UFLA. Além disso, contribuirá significativamente para o crescimento da instituição por meio da geração de resultados de caráter científico, além de utilizar os mesmos animais para experimentos científicos em áreas distintas, otimizando os recursos animais e fortalecendo a parceria e colaboração entre os Departamentos de Zootecnia e de Medicina Veterinária da UFLA.

O primeiro experimento visa contribuir com o entendimento da resposta imune desencadeada pela vacinação contra brucelose bovina com as cepas atualmente utilizadas no Brasil, além de propor uma cepa alternativa. A brucelose é uma zoonose que causa diversos prejuízos para a bovinocultura mundial e uma das principais formas de prevenção é por meio da vacinação das fêmeas jovens (Dorneles et al., 2017). *Brucella* spp. infecta e se replica em células imunes fagocíticas do hospedeiro (principalmente em macrófagos) e, por isso, vacinas contra brucelose bovina devem induzir forte resposta mediada por células (Th1), com proliferação de células T CD4+ e T CD8+, e produção de citocinas como IFN- γ , IL-17A e IL-6. Ambas as vacinas atualmente usadas para controle da doença (B19 e RB51) induzem respostas do tipo Th1, contudo, estudos prévios que observaram diferenças nos perfis induzidos, com uma polarização de linfócitos T CD4+ após a vacinação com B19, enquanto, a RB51 induz maior atuação de linfócitos T CD8+. Estes resultados foram demonstrados por Dorneles et al. (2015) e foram fundamentais para elucidar os mecanismos adaptativos da resposta imune vacinal contra a brucelose, porém, os mecanismos inatos envolvidos no início desta resposta e seu papel na ativação da resposta adaptativa ainda não estão tão claros.

Além disso, do ponto de vista prático, as cepas B19 e RB51 possuem importantes limitações. A B19 é uma cepa lisa recomendada principalmente para vacinação de bezerros de 3 a 8 meses, devido ao risco de aborto em bovinos adultos, excreção da cepa vacinal no leite e persistência de anticorpos vacinais em animais

vacinados mais velhos, que são detectáveis nos testes sorológicos convencionais (Manthei, 1959), gerando resultados falso-positivos e possível descarte de animais saudáveis. Por outro lado, RB51 é uma cepa rugosa que pode ser utilizada tanto em bovinos jovens quanto adultos, uma vez que os anticorpos vacinais não são detectáveis no teste sorológico de rotina, característica denominada DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals* – diferenciação entre animais infectados e vacinados) (Schurig et al., 1991). Porém, a cepa RB51 é um mutante resistente à rifampicina, o que dificulta o tratamento de casos humanos causados por inoculação acidental durante a vacinação, além de prejudicar o diagnóstico destes casos, uma vez que os anticorpos não serão detectados em testes sorológicos (Schurig et al., 1991; Ashford et al., 2004).

Diante dessas limitações, além de entender melhor os mecanismos da resposta imune desencadeados por essas duas cepas vacinais, é fundamental testar e propor cepas alternativas. Estudos anteriores realizados por nossa equipe caracterizaram diversas cepas de *B. abortus* isoladas de animais infectados e encontraram sete mutantes naturais com modificações no lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, apresentando fenótipo rugoso estável, o que sugere que essas cepas podem ser equivalentes a RB51 como uma cepa DIVA, sem o inconveniente da resistência antimicrobiana. Para avaliar a capacidade DIVA destas cepas, suspensões inativadas das mesmas foram inoculadas em bezerras e a resposta imune sorológica foi avaliada no soro durante oito semanas. Além disso, ensaios clínicos randomizados foram realizados inoculando suspensões vivas dessas mesmas cepas em camundongos, a fim de avaliar potencial de imunogenicidade e virulência residual. A partir dos resultados obtidos nestes experimentos, uma das cepas foi eleita como maior potencial para desenvolvimento de uma nova vacina de *B. abortus* contra brucelose bovina.

Os próximos passos são, então, por meio do primeiro experimento proposto por este plano de trabalho, avaliar e caracterizar a resposta imune induzida por essa cepa potencial vacinal na espécie alvo (bovino), descrevendo os mecanismos efetores envolvidos tanto nas respostas inatas e adaptativas após a vacinação, em comparação com B19 e RB51. Além disso, deve-se avaliar a virulência residual desta cepa em bovinos, também em comparação com as cepas atualmente utilizadas como vacinas. Este conhecimento será fundamental para o melhor entendimento do funcionamento das vacinas e, conseqüentemente, otimização de protocolos vacinais, buscando uma maior eficácia vacinal e menor impacto da doença nos rebanhos, além da possível validação de uma cepa vacinal alternativa, sem as limitações das atualmente utilizadas.

O segundo experimento proposto visa contribuir com o aumento da produtividade e a diminuição do impacto ambiental da bovinocultura. Pastos consorciados incrementam a produção animal ao longo do tempo, de forma semelhante ao uso de N-adubo. A mistura de leguminosas pode potencializar este efeito e ainda reduzir a sazonalidade de produção de forragem, garantindo uma maior eficiência de uso do N, o que se reflete na produtividade animal. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas para avaliar os benefícios da inclusão de leguminosas em pastagens. Nesse trabalho, será hipotetizado que a inclusão de amendoim forrageiro e feijão guandu em sistemas de pastejo pode substituir a fertilização de N a longo prazo, melhorar a ciclagem de nutrientes e aumentar a produtividade geral do rebanho, com diminuição da emissão de gases de efeito estufa (GEE).

Este projeto é uma continuação de sequência de trabalhos nos quais foram realizados grandes avanços no manejo de pastos consorciados, gerando os produtos propostos (formação de recursos humanos e conhecimento científico por meio de publicação). Assim é evidente que a continuação da pesquisa deve continuar para poder gerar pacote tecnológico completo, que viabilize o uso de leguminosas em pastagens por parte dos produtores de rurais Minas Gerais. Além desses fatores a projeto contempla uma proposta inovadora, que é a avaliação de pastagens com misturas de leguminosas por longos períodos, quantificando consistentemente o incremento em produtividade oriundo do uso de leguminosas e na mitigação de gases de efeito estufa, além do possível incremento dos benefícios com a mistura de leguminosas em mesmo dossel. Os resultados obtidos têm contribuído significativamente para entender a dinâmica desses sistemas, destacando-se os trabalhos abaixo:

de Kássia Gomes, F., Homem, BGC, Guimarães, BC, de Arruda Camargo Danes, M., Broderick, GA, Alves, BJR, ... Casagrande, DR (2024). Características digestivas de carboidratos e proteínas em bovinos de corte em pastagem tropical adubada ou mista. *Arquivos de Nutrição Animal* , 1–18.

Guimarães, BC, de Kássia Gomes, F., Homem, BGC *et al.* Emissões de N₂O e NH₃ provenientes de excretas bovinas em pastagens adubadas com N ou misturadas com leguminosa forrageira. *Nutr Cycl Agroecosyst* 122 , 325–346 (2022).

Homem, Bruno GC *et al.* Palisadegrass pastures with or without nitrogen or mixed with forage peanut grazed to a similar target canopy height. 1. Effects on herbage mass, canopy structure and forage nutritive value. *Grass and Forage Science*, 2021.

Homem, Bruno GC *et al.* Palisadegrass pastures with or without nitrogen or mixed with forage peanut grazed to a similar target canopy height. 2. Effects on animal performance, forage intake and digestion, and nitrogen metabolism. *Grass and Forage Science*, 2021.

Spasiani Paola Palauro, Homem Bruno Grossi Costa, Lima Italo Braz Gonçalves de, Guimarães Bianca Costa, Medeiros Elias Silva de, Muir James Pierre, Oliveira Marcelo Silva de, Boddey Robert Michael, Casagrande Daniel Rume (2023) Light competition is the key factor determining spatio-temporal variability in legume proportion within Marandu palisadegrass–forage peanut mixed pastures. *Crop & Pasture Science* **74**, 898-910.

Referências:

Ashford, D. A. *et al.* Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v. 22, n. 25-26, p. 3435-3439, 2004.

Dorneles E.M.S., Lima G.K., Teixeira-Carvalho A., Araújo M.S.S., Martins-Filho O.A., Sriranganathan N., Al Qublan H., Heinemann M.B., Lage A.P. Immune Response of Calves Vaccinated with *Brucella abortus* S19 or

RB51 and Revaccinated with RB51. PLoS ONE. 2015;10:e0136696. doi: 10.1371/journal.pone.0136696

Dorneles, E., L. Oliveira, and A. Lage, 2017: Brucella Abortus Vaccines: Use in Control Programs and Immune Response. J. Bacteriol. Mycol. 4, 1–6, DOI: 10.26420/jbacteriolmycol.2017.1044

Manthei, C. A. Summary of controlled research with Strain 19. 1959. 91-97 pp. Disponível em: < <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19602203506> >.

Schurig, G. G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. Veterinary microbiology, v. 28, n. 2, p. 171-188, 1991.

9. METODOLOGIA / FORMA DE DESENVOLVIMENTO

Ambos os experimentos serão realizados na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Lavras, Brasil, em momentos diferentes.

1. Resposta imune após vacinação contra brucelose:

Desenho do estudo e animais

O ensaio será realizado com quatro tratamentos e 15 animais por tratamento, conforme a seguir:

- Grupo 1: animais vacinados com RB51;
- Grupo 2: animais vacinados com S19;
- Grupo 3: animais vacinados com cepa alternativa;
- Grupo 4: animais inoculados com solução salina estéril (NaCl 0,85%).

Os animais utilizados serão bezerros de 3 a 8 meses, sem histórico de vacinação contra brucelose e provenientes de fazenda sem histórico de casos de brucelose.

Vacinação

No dia 0 do experimento, os animais dos grupos 1 e 2 serão vacinados com vacinas comerciais RB51 e B19, utilizando as doses padrão preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): $1,3 \times 10^{10}$ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) e $6,0 \times 10^{10}$ UFC, respectivamente. Os animais do Grupo 3 serão inoculados com uma suspensão viva de $1,3 \times 10^{10}$ UFC (mesma concentração de RB51) da nova cepa potencial vacinal preparada no dia da vacinação em PBS 1X. Os animais do Grupo 4 serão inoculados com 2 mL de solução salina estéril (NaCl₂ 0,85%).

Avaliação clínica dos animais

Cada animal será avaliado clinicamente diariamente no dia da vacinação e nos 21 dias seguintes.

Serão aferidos temperatura corporal por meio da mucosa retal, batimentos cardíacos e frequência respiratória. Serão avaliados ainda as mucosas ocular e gengival e os linfonodos superficiais, por meio de palpação. O local da inoculação da vacina será avaliado diariamente por meio de câmara de detecção de calor para avaliação de inflamação local.

Coleta de sangue

Amostras de sangue serão coletadas por punção jugular nos dias D0, D3, D7, D14 e D28 pós-vacinação. Serão coletados no total 4 tubos de 9 mL de sangue por animal, sendo dois com heparina e dois sem aditivo (para coleta de soro).

Cultura de sangue total de curto prazo, imunofenotipagem, expressão de citocinas e ensaios de fagocitose

Cultura de sangue total de curta duração será utilizada para avaliação da expressão de citocinas citoplasmáticas e para os ensaios de imunofenotipagem. Cinco tubos de poliestireno de 15 mL serão incubados por animal: 2 destinados a marcação intracelular (1 tubo com estímulo e 1 tubo controle), 2 a marcação superficial (1 tubo com estímulo e 1 tubo controle) e 1 a ensaio de fagocitose. Os tubos destinados a marcação intracelular e superficial serão incubados a 37 °C e com 5% de CO₂ contendo, cada um, alíquotas de 1 mL do sangue do animal e 1 mL de meio de cultura RPMI 1640, com ou sem estímulo (*B. abortus* 2308 γ -irradiada, 10⁸ UFC/mL). Para o ensaio de fagocitose, o tubo será incubado nas mesmas condições, contudo o antígeno *B. abortus* será marcado com FITC. Brefeldina A será adicionada nos tubos destinados à marcação intracelular, após 20h de cultura. Tubos com LPS e PMA + ionomicina também serão incubados como estímulo controle (após 20 h de cultura para PMA + ionomicina). A cultura de todos os tubos será finalizada em um total de 24 horas, e as células e citocinas serão marcadas utilizando de acordo com os painéis de anticorpos monoclonais (mAbs) descritos a seguir.

Marcação superficial:

- CD14-RPE-ALEXA 750 + CD80-PE + CD86-FITC
- CD8-ALEXA647 + CD45RO-PE + CD28-FITC+CD196PE-Cy7
- CD4-ALEXA647 + CD45RO-PE + CD28-FITC+ CD196PE-Cy7
- Bru-FITC + CD14-RPE-ALEXA 750 + CD335-PE

Marcação intracelular:

- CD14-RPE-ALEXA 750 + CD4-ALEXA647 + IFN- γ -PE + TNF- α -ALEXA488
- CD8-ALEXA647 + Granzima-PE + Perforina-FITC

Avaliação de citocinas no sobrenadante de cultura

Após as 24 h de cultivo, o sobrenadante de cultura dos tubos destinados a marcação superficial será coletado e armazenado a -20 °C em microtubos estéreis para quantificação de citocinas. Ensaios de ELISA

serão realizados para avaliação de TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6 e IL-4 utilizando kits especializados para citocinas bovinas e de acordo com as recomendações do fabricante.

Avaliação de resposta imune humoral

Os tubos de sangue destinados a coleta de soro serão centrifugados e o soro será coletado e armazenado a -20 °C em microtubos estéreis para avaliação humoral. Os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol (2-ME) serão realizados para avaliar os títulos de anticorpos vacinais semanalmente após a vacinação, sendo esperado anticorpos detectáveis nos animais vacinados com B19. Ensaio de ELISA indireto com antígeno *whole-cell* de cada vacina usada (B19, RB51 e cepa potencial) serão usados para avaliar a soroconversão dos animais de cada grupo.

Aspiração de linfonodo e avaliação de virulência residual

A aspiração de linfonodo será realizada nos dias D7, D14, D28, D42, D56 e D70 pós vacinação. Cada animal será contido e a pele sobre o linfonodo será preparada assepticamente. Um volume de 2 mL de lidocaína 2% será inoculado na pele sobre o linfonodo. Para a aspiração, duas seringas estéreis com agulha de 4 cm de calibre 20 serão utilizadas. Serão realizadas quatro aspirações puxando o êmbolo da seringa, duas em plano horizontal e duas em plano vertical em relação ao linfonodo, divididas igualmente entre as duas seringas. O conteúdo de uma das seringas será destinado a cultura microbiológica para contagem de UFCs por meio de diluição sérica e para qPCR, enquanto a o conteúdo da segunda seringa será distribuído em lâmina histopatológica para avaliação citopatológica e imunocitoquímica.

Análises estatísticas

O software FlowJo 7.6.1 será utilizado para as análises dos dados de citometria de fluxo. As diferenças na expressão das citocinas, marcadores de superfície e intracelulares e recuperação de *Brucella abortus* dos linfonodos entre os grupos experimentais nos diferentes tempos e entre os tempos serão avaliados por análise de variância com o emprego de erro de $\alpha < 0,05$.

2. Consórcio de leguminosas:

O delineamento experimental será em blocos casualizados, com cinco tratamentos e três repetições. Os tratamentos serão:

- 1) Braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) sem adubação nitrogenada;
- 2) Consórcio de Braquiária com *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro);
- 3) Consórcio de Braquiária com *Cajanus cajan* (feijão guandu), semeando no início do diferimento;
- 4) Consórcio de Braquiária com amendoim forrageiro e feijão guandu;
- 5) Braquiária adubada com 150 kg ha⁻¹ano⁻¹ de N.

Estabelecimento de pastagem e tratamento

Em novembro de 2013, toda a área experimental (12 ha) foi corrigida (2.500 kg de cal dolomítica ha⁻¹). Dois meses depois, o capim-marandu foi estabelecido com a aplicação de 52 kg de P ha⁻¹ como superfosfato simples e 41,5 kg de K ha⁻¹ como cloreto de potássio. Em dezembro de 2015, a área experimental foi dividida em 12 pastagens onde os tipos de pastagem foram alocados aleatoriamente e os tamanhos de pastagem foram 0,7, 1,0 e 1,3 ha

Para as pastagens de GRAMÍNEA {*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) R.D. Webster [syn. *Urochloa brizantha* Stapf cv. Marandu]} + N, GRAMÍNEA + AMENDOIM (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. Cv. BRS Mandobi) e GRAMÍNEA, respectivamente (Homem et al., 2021). As pastagens de GRAMÍNEA + AMENDOIM foram semeadas com amendoim forrageiro em dezembro de 2015. Informações mais detalhadas sobre o capim-marandu e o amendoim-forrageiro são descritas por Homem et al. (2021).

Para realização do presente estudo, a área sofreu uma nova divisão em setembro de 2021, passando a ter 20 piquetes, com dimensões de 0,7, 1,0 e 1,3 ha. Os tratamentos serão cinco sistemas de pastejo, incluindo GRAMÍNEA SEM N, GRAMÍNEA + N; GRAMÍNEA + AMENDOIM, GRAMÍNEA + GUANDU [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] e GRAMÍNEA + AMENDOIM + GUANDU. O plantio do feijão guandu foi realizado em fevereiro de 2022, por meio de uma plantadeira de espaçamento 1,10m, com 100 sementes liberadas por minuto.

A lotação contínua com uma taxa de lotação variável será usada para manutenção da oferta de 5 kg de matéria seca (MS) por animal. Duas novilhas Nelore (234 ± 36 kg de PV inicial e 12 ± 1,3 meses de idade) serão utilizadas como animais testes e permanecerão no mesmo tratamento e piquete durante todo o período experimental. Quando necessário, para ajustar a altura do dossel, animais *put-and-take* serão adicionados ou retirados (Allen et al. 2011). Água e suplementos minerais sem N serão fornecidos ad libitum. A altura média do dossel será medida semanalmente usando uma régua de pasto (Barthram 1985) em 80 pontos aleatórios por pasto, e a taxa de lotação será ajustada quando necessário.

Anualmente, na primavera (entre novembro e dezembro), todas as pastagens serão adubadas com superfosfato simples e cloreto de potássio correspondendo a 22 kg ha⁻¹ de P e 41 kg ha⁻¹ de K, respectivamente.

As seguintes características serão avaliadas:

Massa de forragem

Taxa de acúmulo de forragem

Composição botânica do pasto

Valor nutritivo: proteína bruta e digestibilidade in vitro da matéria seca

Dinâmica de serapilheira

Consumo e produção animal

Balanço da ciclagem de N e desempenho animal

Emissão de gases de efeito estufa (GEE)

Massa e acúmulo de forragem e composição botânica do pasto

A massa de forragem será amostrada por meio do corte de seis quadros ao nível do solo, medindo 1 × 0,5 m, por piquete, em locais com altura média do dossel. Após a colheita, o material fresco será pesado e subamostrado com aproximadamente 250 g de material fresco para avaliação da concentração de matéria seca (MS). Uma subamostra adicional de aproximadamente 2 kg será retirada para a separação manual dos componentes botânicos e morfológicos. As amostras da gramínea serão separadas em colmo (caule + bainha), folha (lâmina foliar) e material morto. As amostras de leguminosas serão separadas em estolão e folha (estípula + pecíolo + folheto). As amostras de forragem serão secas em estufa a 55 ° C por 72 horas até um peso constante. A massa da gramínea será considerada folha + colmo sem material morto, e a massa da leguminosa será considerada folha + massa de estolão. Para massa de forragem será considerada a biomassa aérea de plantas herbáceas (massa de gramíneas e leguminosas, conforme tratamento) sem material morto. Para cálculo de material morto do pasto, será utilizado a relação material verde:morto. A relação folha:caule será estimada como a divisão da massa de folhas pela massa de caule com base no peso seco.

No Laboratório de Forragicultura da UFLA, as amostras serão moídas em moinho tipo Wiley, em peneiras com crivo de 2 mm (AOAC, 2000) para se proceder as análises de proteína, os ensaios de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS).

Valor nutritivo

Proteína bruta (PB)

O nitrogênio total (NT) será determinado através do método de Kjeldahl (AOAC, 1995/ 954.01), onde o teor de proteína bruta (PB) será calculado multiplicando-se o valor de NT por 6,25.

Ensaio de digestibilidade in vitro matéria seca (DIVMS)

Para determinação da digestibilidade in vitro da matéria seca será utilizado o equipamento DAISY II Incubator (ANKOM® Technology), conforme descrito segundo Tilley & Terry (1963), com as adaptações descritas por Holden (1999).

Também será estimada a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) através de duas metodologias. Por meio do equipamento DAISYII Incubator (ANKOM® Technology) e também por meio do

ANKOM® Gas Production System.

Os ensaios utilizando a técnica *in vitro* automática de produção de gás com o sistema ANKOM® Gas Production System fornece um método simples para monitorar e medir a produção de gás, através de frascos com volume de 250mL, de módulos sensor de pressão RF, de um sensor que mede a pressão ambiente, e de um software operacional coordenador de base com interface para computador, que efetua as leituras de pressão automaticamente.

As amostras serão adicionadas nas garrafas, o módulo RF sensor será acoplado às mesmas e colocado em estufa à temperatura de 39°C. A pressão no interior dos frascos será registrada automaticamente pelo software em unidades de psi a cada 5 minutos durante 48 h, que permite a elaboração de um gráfico por meio da obtenção de vários pontos da produção de gases, que representa o comportamento da produção de gases em diferentes tempos de fermentação, sendo possível a mensuração da produção de gás total, estimar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e cinética de fermentação.

O meio nutritivo utilizado será preparado a partir de soluções de micro e macrominerais, indicadora e tampão, sendo continuamente saturado com CO₂ e mantido a 39°C até a utilização na incubação, segundo Goering & Van Soest (1970). O pH e a saturação de CO₂ do meio serão controlados pela mudança de cor utilizando o indicador de resazurina, onde será avaliado como pH ótimo valores entre 6,8 e 6,9. Em seguida, em cada frasco será adicionado 0,5 g de amostras pré-secas e moídas em peneira com crivos de 2 mm, 40 mL do meio nutritivo, 2 ml da solução redutora e 10 mL do inóculo ruminal, anteriormente filtrado.

O inóculo ruminal será obtido a partir de amostras compostas das frações sólida e líquida do conteúdo ruminal de bovinos adultos com cânula permanente no rúmen. Após a coleta do conteúdo ruminal será filtrado por meio de quatro camadas de gaze, armazenado em garrafa térmica pré-aquecida à temperatura de 39°C, e em sequência inoculado com CO₂ até o momento da incubação para evitar contaminação com O₂.

Após a preparação das amostras nas garrafas, as mesmas receberão saturação de CO₂ durante aproximadamente 15 segundos, para então o sistema ser fechado e acondicionado na estufa com temperatura regulada para 39°C.

Após o período de fermentação, serão adicionados 2 ml de HCl 6 N em cada frasco para a diminuição do pH a um valor inferior a 2, e também será adicionado 0,5 g de pepsina e incubar por mais 48 horas para estimativa da DIVMS. Após este período o conteúdo do interior dos frascos será filtrado e lavado em filtros de papel previamente pesados. Este resíduo após a filtração será seco em estufa de esterilização à 105°C durante 16 horas, após este tempo os filtros com os resíduos serão pesados e a DIVMS será estimada através do modelo proposto por Goering & Van Soest (1970) na (Eq. XII):

$$\%DIVMS=[1,00-[R-C)-\text{brancopeso da amostra pré seca} * MS]] * 100$$

$$\%DIVMS=[1,00-R-C-brancopeso da amostra pré seca*MS]]*100$$

Onde:

R = Peso do resíduo + filtro de papel;

F = Peso do filtro de papel;

O procedimento metodológico utilizado para a análise da digestibilidade in vitro da matéria seca com o equipamento DAISYII Incubator (ANKOM® Technology) será descrito segundo Tilley & Terry (1963), com as modificações descritas por Holden (1999). Serão utilizados sacos de filtro F57 (porosidade de 57 microns) previamente lavados e enxaguados com acetona P.A. e secos a temperatura de 105°C por 16 horas para a obtenção do peso.

Após este processo será pesado 0,5 g das amostras pré-secas e moídas em peneiras com crivos de 1 mm, nos saquinhos F57 que depois de selados serão distribuídos equitativamente em cada jarro do fermentador artificial DAISYII Incubator, onde cada jarro deve dispor de no máximo 25 amostras. Será colocado nos jarros de digestão as amostras com 1600 ml da solução tampão com pH 6,8 para que a temperatura nos jarros atinja o equilíbrio de 39,5°C, antes de ser adicionado o inóculo ruminal.

Após a coleta e filtração do líquido ruminal, deverá ser adicionado 400 ml do inóculo em cada jarro previamente aquecido e cada jarro será saturado com CO₂, para a partir de então o sistema ser fechado de forma segura para ser incubado por 48 horas. No segundo estágio da incubação será adicionado 8g de pepsina e 40 ml de HCl 6N em cada jarro e procederá a incubação por mais 24 horas. Após este processo os jarros serão drenados e os sacos com amostras serão lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura de 105°C por 16 horas.

Ao final será utilizada a seguinte equação (Eq. XIII):

$$\%DIVMS=100-[(W3-(W1*W4))*100W2*MS]$$

$$\%DIVMS=100-[W3-W1*W4*100W2*MS]$$

Onde:

W1: peso de tara da bolsa

W2: peso de amostras

W3: peso da bolsa final depois de 24 h de digestão com Pepsina + ácido clorídrico

W4: correção da bolsa em branco (peso da bolsa em branco. Depois do ensaio de digestão Pepsina+HCl/ peso da bolsa original)

Dinâmica de serapilheira

A deposição, decomposição e composição química da serapilheira serão medidas ao longo do experimento. O acúmulo e o desaparecimento da serapilheira serão avaliados de acordo com a técnica descrita por Rezende et al. (1999). A cada 28 dias, seis quadros de 1 por 0,5 m serão posicionados em pontos de altura média do dossel e a serapilheira será coletada. A serapilheira será considerada o material vegetal desprendido e morto na superfície do solo (Allen et al. 2011). Quatorze dias após a coleta da serapilheira existente, a serapilheira do mesmo ponto de coleta será coletada e essas amostras serão denominadas serapilheira depositada. Posteriormente, a cada 28 dias, o mesmo procedimento será adotado para o material existente e depositado até o final do experimento. A serapilheira depositada será a soma de toda a serapilheira colhida durante cada estação do ano (Rezende et al. 1999).

Após a coleta, as amostras de serapilheira serão secas em estufa a 55°C por 72 h até peso constante. Após a secagem, todas as amostras de serapilheira serão moídas em moinho Cyclotec (Tecator, Herndon, VA) em peneira com crivo de 1mm. Após a moagem, a MS de cada amostra será obtida por secagem em estufa a 105 C por 18 h (método 934.01; AOAC 2000), e a matéria orgânica (MO) será obtida por incineração a 500°C por 4 h (Moore e Mott 1974). Todos os dados serão expressos com base na MO para eliminar os efeitos das partículas minerais na concentração de nutrientes. As proporções de nutrientes serão obtidas pela divisão das concentrações de nutrientes, todas expressas em uma base de MO (g kg⁻¹ de MO). A constante de decomposição será calculada de acordo com a seguinte equação descrita por Rezende et al. (1999):

$$k = [\ln (L_e (n-1) + L_{dn}) - \ln (L_{en})]/t$$

Onde $L_e (n-1)$ é a quantidade de serrapilheira existente no ciclo anterior, L_{dn} é a quantidade de serrapilheira depositada no ciclo atual, L_{en} é a serapilheira existente no ciclo atual, e t é o tempo do ciclo (14 d). A meia-vida ($t_{1/2}$) será estimada de acordo com a seguinte equação de Rezende et al. (1999):

$$t_{1/2} = \ln (2)/k$$

Onde k será constante de decomposição (g g⁻¹ d⁻¹). O desaparecimento da serapilheira foi estimado pela seguinte equação de Rezende et al. (1999):

$$\text{Desaparecimento de serapilheira} = L_e (n-1) + L_{dn} - L_{en}$$

A concentração total de N será determinada usando o procedimento de Kjeldahl (método 920.87; AOAC 2000). No pasto de GRAMÍNEA + LEGUMINOSA, as proporções de gramíneas e leguminosas nas amostras de serapilheira serão estimadas através da razão dos isótopos naturais ¹²C e ¹³C pela equação:

$$\% \text{ leguminosa} = 100(\delta^{13}\text{C}_{\text{CG}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CS}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{CG}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CL}})$$

Onde % leguminosa é a proporção de carbono de uma leguminosa na amostra de serapilheira, $\delta^{13}\text{C}_{\text{CG}}$ é o valor da abundância de ¹³C do material morto da gramínea, $\delta^{13}\text{C}_{\text{CL}}$ é o valor da abundância ¹³C do

material morto da leguminosa, e $\delta^{13}C_S$ é o valor da abundância de $\delta^{13}C$ das amostras de serapilheira da GRAMÍNEA+LEGUMINOSA.

Para a análise de ^{13}C , as subamostras serão moídas até textura de pó fino em um moinho de bolas, semelhante ao descrito por Arnold e Schepers (2004). As subamostras contendo entre 300 e 500 μg de C serão analisadas para abundância total de C e ^{13}C usando o mesmo espectrômetro de massa de razão de isótopos de fluxo contínuo que será usado para determinar a abundância de ^{15}N .

Consumo e produção animal

Serão coletadas amostras de forragem manualmente durante a avaliação do consumo (três amostras para cada pasto e estação) para análise do valor nutritivo (Vries, 1995). Antes da coleta, um observador bem treinado irá observar o comportamento de pastejo dos animais e com essas observações serão feitas as escolhas dos locais a serem coletados amostras. As amostras de forragem colhidas manualmente serão coletadas no estrato superior do dossel (20% superior do estrato). Nos pastos MISTOS, gramíneas e leguminosas serão coletadas e separadas em laboratório. Amostras de forragem serão secas em estufa a $55^{\circ}C$ por 72 h até peso constante. Em seguida, uma amostra composta de cada espécie será feita para cada unidade experimental.

As amostras compostas serão moídas em moinho Cyclotec (Tecator, Herndon, VA) com peneiras com crivo de 1 mm. A MS de cada amostra será obtida por secagem em estufa a $105^{\circ}C$ por 18 h (método 934.01; AOAC 2000). O consumo de forragem será estimado a partir da excreção fecal e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) uma vez por estação. Amostras fecais pontuais serão coletadas uma vez ao dia, no mesmo horário (meio-dia), obtendo-se, ao final, uma amostra composta produzida para cada animal durante os cinco dias de coleta. Durante os dias de amostragem, as novilhas serão trazidas das pastagens para um brete de manejo para coletar as fezes diretamente da ampola retal (± 100 g). Cada coleta por animal terá uma duração máxima de 5 minutos, a fim de evitar maior estresse animal. Logo após a coleta fecal, cada animal será levado imediatamente para seu respectivo pasto de tratamento. A produção fecal será estimada usando dióxido de titânio como marcador externo (Titgemeyer et al. 2001) durante onze dias consecutivos, seis para adaptação e cinco para coleta. O dióxido de titânio será dosado na quantidade de 10 g animal-1d-1 no momento da primeira coleta de fezes e fornecida diretamente na boca dos animais com o auxílio de um aplicado de bólus para bovinos (Agrovet equipamentos). Amostras fecais serão secas em estufa a $55^{\circ}C$ por 72 h até obtenção de peso constante, a fim de determinar a concentração de MS e, em seguida pesadas e moídas em um moinho Cyclotec (Tecator, Herndon, VA) em peneira com crivo de 1 mm. As amostras fecais serão analisadas quanto à concentração de dióxido de titânio, de acordo com Myers et al. (2004). Amostras fecais e de forragem colhidas à mão serão incubadas no rúmen por 288 h para determinar FDNi (Huhtanen et al. 1994). Duas novilhas canuladas alimentadas com dieta composta de capim-marandu e pastagem mista de amendoim forrageiro e/ou feijão guandu ou monocultivo de capim-marandu serão utilizadas na estimativa da FDNi, de acordo com o tratamento. A excreção fecal será usada para encontrar a quantidade total de iNDF nas fezes; dessa forma, obteve-se a estimativa do consumo de FDNi por dia. Depois disso, o iNDF das amostras colhidas manualmente

será determinado para estimar o consumo de forragem.

No tratamento MISTO, a proporção de gramíneas e leguminosas no consumo de forragem será estimada através da razão dos isótopos naturais ^{12}C e ^{13}C pela equação:

$$\% \text{ leguminosa} = 100(\delta^{13}\text{CG} - \delta^{13}\text{CS}) / (\delta^{13}\text{CG} - \delta^{13}\text{CL})$$

Onde a porcentagem de leguminosa será a proporção de carbono de uma leguminosa nas amostras fecais residuais de FDNi (Lopes de Sá 2017), $\delta^{13}\text{CG}$ é o valor da abundância de $\delta^{13}\text{C}$ do FDNi residual em amostras colhidas à mão de gramínea, $\delta^{13}\text{CL}$ é o valor da abundância $\delta^{13}\text{C}$ do resíduo FDNi em amostras de leguminosas colhidas à mão e $\delta^{13}\text{CS}$ é o valor da abundância de $\delta^{13}\text{C}$ do resíduo de FDNi em amostras fecais.

A abundância de ^{13}C das amostras será determinada conforme descrito para serrapilheira. Para a avaliação de $\delta^{13}\text{C}$, alíquotas contendo entre 200 e 400 μg de C serão analisadas usando um espectrômetro de massa de isótopo de fluxo contínuo automatizado (Finnigan MAT, Bremen, Alemanha) acoplado à saída de um analisador Costech [modelo ECS4010] de C e N total— Finnigan MAT, Bremen, Alemanha, no Laboratório de isótopo John Day Stable da Embrapa Agrobiologia.

A concentração de nitrogênio em amostras de forragem colhidas manualmente será determinada pelo procedimento de Kjeldahl (método 920.87; AOAC 2000) e usado para determinar o consumo de N total na forragem. O consumo de N em kg ha^{-1} será obtido multiplicando-se o consumo diário de N por animal e a carga animal para cada tratamento.

Balanço da ciclagem de N e desempenho animal

O N derivado da fixação biológica (FBN) será estimado por estação usando a técnica de abundância natural do isótopo ^{15}N (Shearer e Kohl 1986). A técnica é baseada na observação de que o N disponível para a planta na maioria dos solos é ligeiramente enriquecido com o isótopo ^{15}N em relação à atmosfera (Okito et al. 2004). Assim, uma planta fixadora de N_2 terá uma abundância menor de ^{15}N do que uma planta de controle não fixadora que é inteiramente dependente do N do solo. A massa das leguminosas e as plantas não fixadoras serão analisadas quanto à abundância de ^{15}N . O material vegetal será seco em forno a 55°C por 72 h até um peso constante e moído em um moinho de bolas, até obtenção de pó fino (Arnold e Schepers, 2004). A abundância de ^{15}N das amostras será determinada conforme descrito para a abundância de ^{13}C da serrapilheira. As amostras para análise irão conter entre 30 e 50 μg de N. De acordo com a metodologia, o N derivado da atmosfera (% Ndfa) será calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ Ndfa} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{referência}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Leguminosa}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{referência}} - \text{B}) \times 100$$

Onde $\delta^{15}\text{N}_{\text{referência}}$ será o valor $\delta^{15}\text{N}$ do solo obtido de plantas não fixadoras crescendo junto com a leguminosa, $\delta^{15}\text{N}_{\text{leguminosa}}$ será o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para a planta fixadora de N_2 e B será a abundância natural de ^{15}N do N derivado da fixação biológica de N na leguminosa. O amendoim forrageiro e o feijão guandu são

plantas fixadoras de nitrogênio. Plantas não fixadoras de N₂ que crescem nas proximidades das unidades experimentais serão usadas como plantas de referência para avaliar a abundância de 15N do solo disponível para plantas.

A quantidade de N biologicamente fixada na biomassa aérea da leguminosa será (kg N ha⁻¹) foi calculada como:

$$N_{dfa} = N_{acumulado} \times \%N_{dfa}$$

Onde N_{dfa} será a quantidade total de N na biomassa aérea leguminosa derivado de FBN (kg N ha⁻¹temporada⁻¹), N acumulado será a quantidade total de N da leguminosa depositado na serapilheira somada a quantidade de N da leguminosa ingerida pelos animais (kg N ha⁻¹temporada⁻¹), e a %N_{dfa} é a %N_{dfa} na biomassa aérea da leguminosa.

A excreção fecal de N (g N d⁻¹) será avaliada pela concentração de N nas fezes (método 920.87; AOAC 2000) multiplicado pela produção fecal total. A excreção urinária será estimada por meio de amostras pontuais de urina, obtidas por estimulação vulvar ao mesmo tempo que as amostras fecais serão coletadas. Uma alíquota de aproximadamente 12 mL será retirada e serão adicionados 48 mL de ácido sulfúrico 0,02 N (H₂SO₄) (Chen e Gomes 1992). Uma amostra composta 5-d será coletada e armazenada em um frasco plástico a -20°C. A concentração de creatinina na urina será determinada por meio de um kit comercial (Creatinine K, Labtest, Lagoa Santa, Brasil). O volume de urina será estimado usando a concentração de creatinina como marcador e assumindo uma produção diária de creatinina, de acordo com a seguinte equação (Silva et al. 2012):

$$UV = (0,0345 \times SBW^{0,9491}) \div UCc$$

Onde UV (L d⁻¹) será a produção urinária total diária, SBW (kg) o peso corporal reduzido e UCc (g L⁻¹) a concentração de creatinina na urina. A excreção urinária de N (g de N d⁻¹) será determinada por sua concentração de N em relação ao volume urinário (método 920.87; AOAC 2000). O N excretado nas fezes e urina em kg ha⁻¹ será obtido multiplicando a excreção diária de N por animal e a taxa de lotação para cada tratamento. O N retido no animal será medido pela diferença entre a ingestão de N e a excreção de N nas fezes e na urina.

Por fim, o balanço da ciclagem de nitrogênio será medido de acordo com os valores de N reciclado via serrapilheira e excreção do rebanho. A absorção pelas plantas será considerada como N da serapilheira depositada + ingestão total de N pelas novilhas + mudança na biomassa de N. A produção de nitrogênio será considerada o N retido pelo animal (produto) e as perdas. O nitrogênio retido será calculado pela diferença entre a ingestão de N e a excreção de N pelo rebanho. E as perdas de nitrogênio estimadas com base em uma perda de 5% de N nas fezes e 50% de N na urina (Boddey et al. 2004). O nitrogênio reciclado nas fezes e na urina será calculado pela diferença entre a excreção de N pelo rebanho e as perdas de N. O nitrogênio armazenado na carcaça do animal será calculado como peso vivo \times 0,025 (Scholefield et al. 1991).

Emissão de gases de efeito estufa

As emissões da produção entérica de GEE serão medidas usando a técnica do traçador SF₆ (Johnson et al., 1994) seis dias de cada estação. Tubos de permeação de latão (comprimento = 4,4 cm, diâmetro externo = 1,43 cm, diâmetro interno = 0,79 cm, profundidade interna = 3,8 cm e volume = 1,86 mL), com arruelas de náilon e uma membrana de Teflon (508 µm), fixada com um tecido poroso (2 -µm porosidade) de aço inoxidável e uma porca de latão, serão usados em cada boi. Os tubos de permeação serão preenchidos com aproximadamente 2,0 g de hexafluoreto de enxofre (SF₆). Os tubos de permeação serão mantidos a 39°C e pesados 17 vezes em 60d, onde a taxa de liberação será calculada e estipulada para cada animal. Os tubos de permeação serão ofertados para os animais por meio de pistola de bolas 7 dias antes do experimento. Para fornecimento dos tubos, os animais serão levados para o curral de manejo onde, individualmente, receberão por meio da pistola de bolas e de forma oral, os tubos de permeação, levando até 2 minutos cada aplicação por animal. Após a aplicação, os animais retornaram para o pasto e ficaram sendo observados durante 24 horas.

Para coleta de metano serão utilizados tubos de cloreto de polivinila (PVC) com um volume total de 2 L. As amostras serão coletadas evacuando os recipientes de coleta a 68,6 cm Hg e conectando o recipiente a um cabresto, que será equipado com um tubo capilar ondulado posicionado para amostrar, usando um desenho em alça, de ambas as narinas. O volume dos recipientes de coleta e o fluxo dos tubos capilares serão projetados para permitir que metade do vácuo permaneça após 24 horas. Quatro equipamentos de coleta e tubos capilares serão usados para determinar as concentrações ambientais de CH₄ e SF₆ e colocados, um em cada direção (Norte, Sul, Leste e Oeste) da área experimental total. Foi proposto por Haisan et al. (2014) para considerar qualquer animal com pelo menos 2 dias de medições válidas de CH₄. Para o experimento atual, apenas novilhas com pelo menos 3 dias de coleta e medição bem-sucedidas serão consideradas na análise final das variáveis GEE.

10. RESULTADOS ESPERADOS

O primeiro experimento visa avaliar as repostas imune e adaptativa desencadeadas pela vacinação com cepas de *B. abortus* B19 e RB51 e por uma cepa alternativa, além de avaliar a virulência residual desta última. Espera-se caracterizar as células e citocinas envolvidas no início da resposta após vacinação e na ativação da resposta inata. Além disso, espera-se não encontrar diferenças significativas entre as repostas induzidas pelas cepas convencionais (B19 e RB51) e a cepa alternativa, principalmente em relação a produção in vitro de IFN-γ, que é a citocina de assinatura em respostas contra brucelose. Em relação ao perfil celular induzido (polarização e linfócitos TCD4+ ou TCD8+), espera-se que a cepa alternativa apresente um perfil de resposta mais semelhante ao da cepa RB51, uma vez que ambas são cepas rugosas. Por fim, espera-se validar a nova cepa com uma alternativa para a imunização contra brucelose bovina, trazendo grande contribuição para o controle da doença no Brasil e no mundo.

O segundo projeto visa combinar diferentes espécies de leguminosas que apresentam potencial de produção de forragem em épocas distintas do ano. Espera-se que essa estratégia promova um aumento significativo na fixação de nitrogênio no solo, contribuindo para a fertilidade e a saúde do ecossistema. Além

disso, a adoção dessas práticas tem o potencial de reduzir significativamente as emissões de gases de efeito estufa associadas à produção pecuária. Antecipa-se que essa abordagem resultará em benefícios ambientais substanciais, além de melhorar a sustentabilidade e a eficiência do sistema de produção agrícola.

III – PRAZO DO COMODATO

11. PRAZO EM QUE OS SEMOVENTES PERMANECERÃO SOB POSSE DA UFLA

12 meses

IV – PLANO DE TRABALHO DO COMODATO

12. SERVIDOR RESPONSÁVEL PELA GUARDA DOS ANIMAIS

Função no Projeto	Nome	CPF
Coordenador	Daniel Rume Casagrande	310.228.088-93
Instituição	Cargo/Função:	
UFLA	Professor Associado	

13. ESPECIFICAÇÕES DOS ANIMAIS

QUANTIDADE	RAÇA	IDADE	PESO	SEXO
100	Animais zebuínos de linhagem comercial da raça Nelore	6 a 7 meses em Julho de 2024	De 180 a 210 kg	Fêmeas não vacinadas contra brucelose bovina
CARACTERÍSTICAS VISUAIS		CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS		FAIXA DE PREÇO POR ANIMAL
Animais com boa condição corporal, sadios, com pelagem branca, com boa conformação dos membros anteriores e posteriores.		Novilhas, incluindo alto ganho de peso, eficiência alimentar, boa conformação corporal, resistência e temperamento tranquilo.		R\$1.500 a R\$ 1.800

OBSERVAÇÃO: 60 animais devem ser entregues até Julho de 2024 e o restante (40 animais) até Outubro de

2024.

14. CRONOGRAMA

FASE DO PROJETO EM QUE SERÃO UTILIZADOS OS ANIMAIS	ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS	PERÍODO (em meses)
Recepção e adaptação	Recepção dos animais, tratamento contra endo e ecto parasitas, identificação individual, pesagem, acondicionamento nos piquetes experimentais.	Mês 1
Execução do primeiro experimento	Vacinação contra brucelose (D0), avaliação clínica diária (21 dias seguintes a vacinação), coleta de sangue (D0, D3, D7, D14, D28) e aspiração de linfonodos (D7, D14, D28, D42, D56 e D70).	Meses 2, 3 e 4
Execução do experimento	Os animais serão manejados em curral de manejo uma vez a cada 30 dias para pesagens, e uma vez em cada estação do ano os animais serão manejados para coleta de fezes, urina e metano. Após as últimas pesagens e amostragens, os animais serão devolvidos ao criador.	Meses 4 a 11

V – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CONSELHO DEPARTAMENTAL

Declaro, para os devidos fins de direito, na função de Chefe do Departamento de Zootecnia que o presente plano de trabalho foi aprovado, “ad referendum” do Conselho Departamental, nos termos regimentais, por meio da Portaria DZO/FZMV Nº 9, DE 14 DE maio de 2024, anexa a este projeto.