RENATA CAMINHA GOMES

**Influência etária na resposta imunológica de
bezerros à vacinação intranasal**

São Paulo
2016

RENATA CAMINHA GOMES

Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3308
FMVZ

Gomes, Renata Caminha
Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal / Renata Caminha
Gomes. -- 2016.
145 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Resposta vacinal. 2. Via intranasal. 3. Bezerro. 4. Sistema respiratório.
5. Immunossupressão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal", protocolado sob o nº 2799/2012, utilizando 16 (dezesesseis) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Influence of age the immune response of calves to intranasal vaccination", protocol number 2799/2012, utilizing 16 (sixteen) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOMES, Renata Caminha

Título: **Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*A toda a minha família, o alicerce da
minha vida. Cada um tem uma especial
parcela de influência na longa jornada de
chegar até aqui. Dedico em especial aos meus
pais, Múcio e Sônia, que me guiaram para os melhores
caminhos, sempre escutando minhas
dificuldades e me ajudando a resolvê-las. Só consegui escrever uma tese hoje
porque tive o apoio de vocês para tudo. Nada me deixa mais feliz do que sentir o orgulho de
vocês, então espero que esse momento seja um deles. Amo demais vocês!*

AGRADECIMENTOS

*Antes de todos, a Deus e ao meu anjo da guarda,
tenho a certeza que estavam segurando minha mão a cada passo.*

*À minha família,
pelo apoio moral, amoroso e muitas vezes financeiro.*

*Aos meus tios Humberto e Cleonice,
não tenho palavras para demonstrar minha gratidão por terem me acolhido por todos esses
anos com atenção e carinho.*

*Aos meus primos Marta e Thiago,
obrigada pelas conversas, paciência e convívio. Marta, muito obrigada pelo carinho,
companhia e ajuda com os bezerros, e por me dar soluções para problemas no biotério.
Thiago te agradeço pelas inúmeras vezes que me ajudou tecnologicamente sempre que tive
problemas com os eletrônicos rss.*

*A Eunice,
por ter me ajudado tanto em casa sempre que precisei.*

*À minha orientadora Alice,
aqui agradeço mais uma vez a Deus por ter te colocado no meu caminho... ou devo agradecer
por eu ter me colocado no seu ao me sentar ao seu lado no ônibus e pedindo para me
orientar? Você é uma pessoa sensacional e que me recebeu de coração aberto sem nem
mesmo me conhecer. Obrigada por me ajudar a crescer pessoal e intelectualmente.*

À equipe Della Libera,

*Heloisa, você é uma amiga de outras vidas e minha sub-orientadora. Obrigada por
ser o que é e por me ajudar sempre que pedi.*

*Camila, apesar de sermos totalmente diferentes, nossa amizade se ajustou e se
aprofundou. Agradeço muito por ter dado certo irmos juntas ao Canadá, pois nos tornamos
grandes parceiras. Obrigada pela constante prontidão em ajudar e pelo carinho.*

Bruna, foi seu otimismo que me fez acreditar que podia entrar na USP.

Gabriela, obrigada pelos momentos felizes e descontraídos.

Kamila, você também é uma grande parceira e está sempre à disposição para ajudar em tudo e a todos.

Fernando, nosso gênio amigo. Te agradeço imensamente pelas inúmeras ajudas e por acender muitas lâmpadas na minha cabeça.

Rodrigo. Obrigada pelas suas idéias criativas e pela sua positividade.

Maiara, obrigada por nos ajudar tanto, de longe e de perto.

Jéssyca, nossa caçula. Obrigada por nos socorrer nos momentos em que mais precisamos.

Nicholas V. Del Bigio, Erika Zolczák, Endrew Rodolfo, muito obrigada pela ajuda com os bezerros.

Aos órgãos que me forneceram bolsa de estudos durante esses quatro anos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo: 2012/19192-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Universidade de São Paulo, em particular ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por ter me aceito.

Ao CCInt-FMVZ por ter possibilitado o ingresso no Emerging Leaders in the Americas Program na University of Saskatchewan, Canadá.

Ao Dr. Philip Griebel e sua equipe, em especial Patricia e Natasa, pelos ensinamentos e pela maneira como nos acolheram e nos guiaram.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial Maristela Pituco e Cláudia Pestana pela realização de análises da virusneutralização e por nos receberem sempre tão bem.

Ao professor Marcos Bryan, pela análise de Leptospira nas amostras.

Às meninas do laboratório

Samanta, Maria Helena, Clara, Cláudia, Marly, Dona Carmen, Dinha e Creide pelo carinho, treinamento e esclarecimento de dúvidas.

*Às secretárias do Departamento de Clínica Médica,
Silvana, Cida e Carol pela atenção e ajuda.*

*À Adelaide,
por sua assessoria e esclarecimentos.*

*Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica,
pela manutenção dos equipamentos, pela limpeza, pelo café e por toda a atenção.*

*Aos Funcionários do Hospital de Bovinos e Pequenos Ruminantes,
sr. Luis, sr. Edson, sr. Francisco e Duque por nunca nos negar ajuda e pelo cuidado com os bezerros.*

*Aos residentes do Hospital de Bovinos e Pequenos Ruminantes,
por podermos sempre contar com sua ajuda e conhecimento.*

*Aos professores do Departamento de Clínica Médica,
Archivaldo Reche Junior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Denise Saretta
Schwartz, Enrico Lippi Ortolani, Fábio Celidônio Pogliani, Fernando José Benesi, Lilian
Gregory, Marcia Gomes, Marcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Maria
Claudia Araripe Sucupira, Mitika Kurubayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Bacarin,
Silvia Regina Ricci Lucas, Viviani Gomes e Wilson Roberto Fernandes. Obrigada pelo
compartilhamento da experiência, pela ajuda e instrução.*

*Aos colegas pós-graduandos,
obrigada pelo companheirismo, alegrias, tristezas, preocupações e superações
compartilhadas.*

*Ao amigo Giancarlo,
por nos auxiliar na providência de uma fazenda.*

Aos meus amigos,

que se encontram espalhados pelo Brasil e mundo, mas sempre a par do que acontece na minha vida e torcem pelo meu sucesso.

Ao Maurício Rodrigues de Oliveira,

pelo apoio infalível, pelos momentos de alegria e leveza e por sempre acreditar no meu potencial torcendo tanto por mim.

*Um livro em...caminha
Um sonho que me realiza
Um surdo que responde
Um mudo que me ensina
Um cheiro que me lembra
Um cego que me guia*

Caminha.

Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.

Clarice Lispector

RESUMO

GOMES, R. C. **Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal**. [Age influence on immune response of calves to intranasal vaccination]. 2016. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Devido à intensa oscilação de funções e mecanismos de defesa respiratórios evidenciados nos primeiros meses de vida dos bezerros, o discernimento do limiar etário para a resposta vacinal intranasal efetiva, atrelado ao risco de infecção e perfil da vacina são fundamentais para a pecuária racional. Diante disto, o estudo buscou comparar a resposta imune humoral e mediada por células, local e sistêmica, entre bezerros vacinados intranasalmente aos 15 ou 45 dias de vida com vacina polivalente contendo vírus sincicial respiratório bovino vivo modificado, cepas quimicamente alteradas de herpesvirus bovino tipo 1 e vírus da parainfluenza tipo 3, vírus da diarreia viral bovina tipos 1 e 2 inativados, além de culturas inativadas dos cinco sorotipos de *Leptospira* e adjuvante Quil-A. Foram utilizados 16 bezerros holandeses alocados em três grupos, o grupo GA composto por seis animais primovacinados aos 15 dias de idade, o grupo GB composto por cinco animais primovacinados aos 45 dias de idade e o grupo controle composto por cinco animais não vacinados. Os animais vacinados receberam uma segunda dose vacinal 21 dias após a primeira. Para avaliação da interferência da vacinação intranasal no estado geral dos bezerros, na expressão das populações leucocitárias, na capacidade fagocítica e microbicida, além da investigação de anticorpos humorais e locais, foram realizados exames clínicos e colhidas amostras de sangue e lavado broncoalveolar (LBA) antes da primeira e da segunda dose vacinal, bem como uma terceira colheita 21 dias após a segunda dose. Foi observado que após a vacinação a maioria dos animais vacinados apresentou manifestações clínicas respiratórias, acompanhadas de leucograma com declínio de leucócitos totais e linfócitos nos animais do GA em relação ao CTLA. Nos animais do GB além das manifestações clínicas, foi encontrada somente uma tendência ao aumento de neutrófilos em relação ao CTLB. Houve diminuição de macrófagos alveolares e aumento de neutrófilos sanguíneos e alveolares tanto na citologia do LBA quanto na imunofenotipagem dos animais do GA em relação ao CTLA e diminuição de macrófagos na citologia do LBA ao longo dos momentos do GA, enquanto que nos animais do GB houve diminuição de monócitos-like CD14⁺ ao longo dos momentos. Simultaneamente ao aumento de monócitos CD14⁺ ao longo dos momentos, foi notado o aumento de linfócitos

TCD3⁺CD4⁻CD8⁻ nos animais do GA ao longo dos momentos e em relação ao CTLA. Além disso, a porcentagem de linfócitos sanguíneos TCD3⁺ aumentou no GA em relação ao CTLA, porém não acompanhada pelo aumento na porcentagem de células TCD4⁺ ou TCD8⁺ mas sim pelas populações TCD3⁺CD4⁻CD8⁻ ao longo dos momentos e em relação ao CTLA e TCD3⁺CD4⁺CD8⁺ em relação ao CTLA. No LBA a porcentagem de células CD4⁺ diminuiu em relação ao CTLA. Nos animais do GB não houve diferença entre essas populações celulares, somente a diminuição de células CD4⁺CD8⁺ em relação ao CTLB no LBA. Ao se avaliar as funções de fagocitose e microbicida dos grupos vacinados, foi constatada diminuição expressiva na maioria das avaliações após a vacinação, principalmente em relação ao GA. Em relação à resposta humoral por anticorpos, o estudo demonstrou que a resposta vacinal por via intranasal não sofreu influência de anticorpos colostrais, tampouco induziu imunidade sérica específica por anticorpos, no entanto, no LBA foi capaz de induzir aumento de IgA nos animais do GA e uma tendência ao aumento em animais do GB. Diante dos resultados, conclui-se que: a resposta à vacina utilizada por via intranasal em bezerros com 15 dias de idade é diferente de quando utilizada aos 45 dias, e que causou alterações de exame clínico, leucograma e citologia do LBA mais intensas nos animais vacinados aos 15 dias de idade. Embora não apresente resposta anticorpo específica sistêmica em ambos os casos, aos 15 dias apresentou resposta neutrofílica e monocítica sistêmica acompanhada de aumento de linfócitos T duplo negativos e duplo positivos, enquanto a resposta local celular foi pobre em macrófagos e rica em neutrófilos e IgA, porém com comprometimento das funções celulares. Dessa forma, a vacina utilizada nesse período, por via intranasal, em especial aos 15 dias de idade pode predispor o animal a infecções bacterianas secundárias. No entanto, deve-se ficar claro que este resultado se aplica somente a estas condições de vacina, via e idade.

Palavras-chave: Resposta vacinal. Via intranasal. Bezerro. Sistema respiratório. Imunossupressão.

ABSTRACT

GOMES, R. C. **Age influence on immune response of calves to intranasal vaccination.** [Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal]. 2016. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Due to the intense oscillating of functions and respiratory defense mechanisms evidenced in the first months of life of calves, the discernment about the age threshold for the effective intranasal vaccine response, linked to the risk of infection and vaccine's profile are fundamental to rational livestock. In view of this, the study aimed to compare the humoral immune response and local and systemic cell-mediated among calves vaccinated intranasally to 15 or 45 days of life with polyvalent vaccine containing bovine respiratory syncytial modified live virus, chemically altered strains of bovine herpesvirus type 1 and parainfluenza virus type 3, inactivated bovine viral diarrhea types 1 and 2, inactivated cultures of five *Leptospira* serovars and Quil-A adjuvant. 16 Holstein calves were allocated in three groups, the GA group consisting of six animals vaccinated at 15 days of age, the GB group consisting of five animals vaccinated at 45 days of age and the control group of five animals not vaccinated. Vaccinated animals received a second immunization dose 21 days after the first one. To evaluate the impact of intranasal vaccination in the general condition of the calves, in the expression of leukocyte populations, phagocytic and microbicide capacity, as well as research of humoral and local antibodies, clinical examinations were performed and blood and bronchoalveolar lavage (BAL) samples were collected before the first and second vaccine vaccination, as well as a third sample 21 days after the second dose. It was observed that after vaccination most vaccinated animals showed respiratory clinical manifestations, accompanied by white blood cell count with decline of total leukocytes and lymphocytes in GA animals compared to CTLA. In GB animals beyond the clinical manifestations, it was only found a tendency to increase in neutrophils in relation to CTLB. There was a decrease in alveolar macrophages and increased blood and alveolar neutrophils in both BAL cytology and immunophenotyping of GA animals compared to the CTLA and reduction of macrophages in BAL cytology over the times in GA animals, whereas in GB animals there was a decreased in CD14⁺ monocyte-like along time. Simultaneously with the increase in CD14⁺ monocytes over the time, it was noted an increase in TCD3⁺CD4⁻CD8⁻ lymphocytes in GA animals along time and compared to CTLA. Furthermore, the percentage of TCD3⁺ blood lymphocytes increased

in GA compared to the CTLA but it was not accompanied by an increase in the percentage of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells but by $TCD3^+CD4^-CD8^-$ population along time and compared to the CTLA and $TCD3^+CD4^+CD8^+$ cells compared to CTLA. In BAL the percentage of $CD4^+$ cells decreased compared to CTLA. In animals GB there was no difference between these cell populations, only the reduction of $CD4^+CD8^+$ BAL cells compared to CTLB. When evaluating the phagocytosis and microbicidal functions of the vaccinated groups it was observed significant decrease in most evaluations after vaccination, especially in relation to GA. Regarding the humoral antibody response, the study demonstrated that the vaccine response by intranasally route was not influenced by colostral antibodies, either induced serum specific immunity antibodies, however, in BAL was able to induce increase of IgA in GA animals and a tendency to increase in GB animals. Given the results, it is concluded that: the response to the vaccine used intranasally in 15 days old calves is different than when used at 45 days, and it caused clinical examination, WBC and BAL fluid cytology more intense changes in animals vaccinated at 15 days of age. Although it has not systemic specific antibody response in both cases, after 15 days showed neutrophilic and monocytic systemic response accompanied by increase of double negative and double positive T lymphocytes, while the local cell response was poor in macrophages and rich in neutrophils and IgA, but with impairment of cellular functions. Thus, the vaccine used intranasally in that period, particularly at 15 days of age may predispose an animal to secondary bacterial infections. However, it should be clear that this result applies only to these conditions of vaccine, route and age.

Keywords: Vaccine response. Intranasal route. Calf. Respiratory system. Immunosuppression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	aloficocianina
CD	grupo de diferenciação
CDRB	Complexo Doença Respiratória dos Bovinos
CTLA	grupo controle de GA
CTLB	grupo controle de GB
DCFH-DA	diacetato de diclorofluoresceína
Ec-PI	<i>Escherichia coli</i> conjugada a iodeto de propídio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	espécies reativas de oxigênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSC	<i>forward scatter</i>
GA	grupo A
GB	grupo B
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HVB-1	herpesvírus bovino tipo 1
IFN γ	interferon-gamma
Ig	imunoglobulina
IL	interleucinas
ISCOMs	complexo imuno estimulante
LB	linfócitos B
LBA	lavado broncoalveolar
Lkt	leucotoxina
LPS	lipopolissacarídeo
LT	linfócitos T
M1	momento 1
M2	momento 2
M3	momento 3
MALT	tecido linfóide associado à mucosa
MDBK	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
MGIF	média geométrica de intensidade de fluorescência

MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MLV	vírus vivo modificado
MØ ₁	macrófagos classicamente ativados
MØ ₂	macrófagos alternativamente ativados
NALT	tecido linfóide associado à nasofaringe
NK	<i>natural killer</i>
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão fosfato-salino
PE	ficoeritrina
PECy5	ficoeritrina-cianina 5
PI	iodeto de propídio
PI-3	vírus da parainfluenza bovina tipo 3
pvMD	<i>post vaccinal mucosal disease</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAM	soroaglutinação microscópica
Sa-PI	<i>Staphylococcus aureus</i> conjugado a iodeto de propídio
SFB	soro fetal bovino
SSC	<i>side scatter</i>
TCID ₅₀	50% <i>tissue culture infective doses</i>
TCR	receptor de células T
TGFβ	fator de transformação do crescimento beta
TLR	<i>toll like receptors</i>
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
VDVB-1	vírus da diarreia viral bovina
VS RB	vírus sincicial respiratório bovino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	COMPLEXO DOENÇA RESPIRATÓRIA DOS BOVINOS	23
2.2	RESPOSTA IMUNE.....	24
2.3	MATURIDADE IMUNE	30
2.4	VACINAS DISPONÍVEIS.....	31
2.5	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	32
2.6	RESPOSTA VACINAL	34
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS	39
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO AMOSTRAL.....	39
4.3	VACINA	40
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.4.1	Exame clínico e exame específico do sistema respiratório	42
4.5	COLETA DAS AMOSTRAS	43
4.5.1	Coleta de sangue.....	43
4.5.2	Coleta de lavado broncoalveolar	43
4.5.2.1	Isolamento da suspensão celular do LBA	44
4.5.2.2	Viabilidade e concentração celular das amostras de LBA	44
4.6	ANÁLISES LABORATORIAIS	45
4.6.1	Leucograma	45
4.6.2	Avaliação citológica do lavado broncoalveolar	45
4.6.3	Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e pulmonares	46
4.6.4	Imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos e pulmonares.....	46
4.6.5	Análise da citometria de fluxo.....	48

4.6.5.1	Análise do sangue	48
4.6.5.2	Análise do LBA	54
4.6.6	Detecção de anticorpos	57
4.6.6.1	Anticorpos antivirais neutralizantes	57
4.6.6.2	Anticorpos antivirais específicos	58
4.6.6.3	Anticorpos antibacterianos	58
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS	60
5.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	60
5.2	EXAMES CLÍNICO GERAL E ESPECÍFICO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	60
5.3	ANÁLISES DO SANGUE	62
5.3.1	Leucograma	62
5.3.2	Imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos	66
5.3.3	Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos	71
5.3.4	Pesquisa de anticorpos	78
5.3.4.1	Anticorpos antivirais neutralizantes	78
5.3.4.2	Anticorpos antivirais específicos	82
5.3.4.4	Anticorpos antibacterianos	83
5.4	ANÁLISES DO LBA	84
5.4.1	Citologia	84
5.4.2	Imunofenotipagem dos leucócitos pulmonares	86
5.4.3	Avaliação funcional de fagócitos pulmonares	89
5.4.3	Pesquisa de IgA local	100
6	DISCUSSÃO	101
6.1	EXAME CLÍNICO GERAL E EXAME ESPECÍFICO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	101
6.2	LEUCOGRAMA	104

6.3	CITOLOGIA DO LBA	106
6.4	IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS E PULMONARES	108
6.4.1	Células polimorfonucleares	108
6.4.2	Células mononucleares	111
6.5	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS FAGÓCITOS SANGUÍNEOS E PULMONARES	118
6.6	PESQUISA DE ANTICORPOS	121
7	CONCLUSÕES	124
	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

Nos primeiros meses de vida, os bovinos vivenciam a oscilação constante de uma série de funções, dentre as quais mecanismos imunológicos de defesa respiratórios (BERTAGNON et al., 2007; BATISTA et al., 2012, 2015; BERTAGNON, 2015) que influenciam na resposta à vacinação intranasal para prevenção de um importante complexo nosológico descrito como Complexo Doença Respiratória dos Bovinos (CDRB).

Diante do cenário mundial de morbidade e mortalidade de bezerros por doenças respiratórias (HICKEY; DRENNAN; EARLEY, 2003; LYNCH et al., 2011), alguns estudos apontam o uso de vacinas no período neonatal como medida profilática. Apesar disso, a imaturidade do sistema imune neonatal, voltada para o perfil Th2, somada a possibilidade da interferência de anticorpos maternos são frequentemente citados como razões pelas quais a vacinação não induz resposta imune protetiva nessa idade (CHASE; HURLEY; REBER, 2008; GRIEBEL, 2009; SILVA, 2015), estudos contrariam essas informações uma vez que a vacinação precoce e por via intranasal estimulou resposta protetiva específica humoral e celular inclusive sob a presença de anticorpos colostrais (ELLIS et al., 2007; WOOLUMS et al., 2013).

A vacinação que funciona estimulando o sistema imunológico no combate a infecções, aparece como abordagem promissora e necessária no tratamento e prevenção de doenças (SIEGRIST, 2008). O reconhecimento da porta de entrada para doenças infecciosas e da relevância da resposta imune de mucosa para proteção, tem encorajado o desenvolvimento de vacinas administradas via mucosa, principalmente oral e intranasal para o estímulo de tecidos linfóides (SHEWEN et al., 2009; CHEN; CERUTTI, 2010).

Dessa forma, a imunização intranasal tem sido considerada atraente uma vez que induz imunidade antígeno-específica no trato respiratório, especialmente no tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) (REBELATTO; MEAD; HOGENESCH, 2000; TANAKA et al., 2007; LAMICHHANE; AZEGAMIA; KIYONOA, 2014). Ao que tudo indica, essa é a via mais eficaz para induzir imunidade da mucosa do trato respiratório, especialmente por meio da administração de vacinas contendo antígenos vivos. Entretanto, a maioria das vacinas disponíveis contra as doenças respiratórias em bovinos é indicada pela via parenteral (REBELATTO et al., 2001).

O CDRB, por sua vez, tem por desafio sua diversidade de agentes etiológicos e respectivas associações (AMES; BAKER; WIKSE, 2006). Dentre os quais, o vírus sincicial respiratório bovino (VSRB), o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (PI-3), o herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1) e o vírus da diarreia viral bovina (VDVB-1), que podem atuar sinergicamente ou com bactérias, como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus* e *Mycoplasma bovis* e causar lesões broncopneumônicas de variada monta (BABIUK; LAWMAN; OHMANN, 1988; BAKER, 1995).

Nesse contexto, a indicação da vacinação polivalente contendo os principais patógenos responsáveis pelo CDRB, e a precocidade desta submeteria um número expressivo de animais à implementação de um protocolo vacinal proposto para um manejo racional, considerando o risco de exposição aos patógenos, risco de infecção e variação de resposta imune de uma faixa etária de acordo com a via de aplicação e perfil das vacinas disponíveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos econômicos: as cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (BRASIL. ~~MINISTÉRIO DA AGRICULTURA~~, 2016). Alia-se a sua importância econômica direta, a necessidade de produzir com responsabilidade sócio-ambiental, uma realidade cada vez mais inserida em nossas preocupações globais (FAO; WHO, 2015). Neste contexto, a frequência e a intensidade de doenças, principalmente com sintomatologia respiratória, têm aumentado de maneira acentuada, sendo os problemas de saúde mais graves quando relacionados à criação de bezerros (VAN DER POEL et al., 1994).

Diante da realidade que a maior frequência de ocorrência de broncopneumonias em bovinos ocorre até o quinto mês de idade (GONÇALVES et al., 2000) e que essas doenças são geralmente desencadeadas por agentes virais que causam imunossupressão (AMES; BAKER; WIKSE, 2006) e podem preceder a infecção bacteriana, a vacinação precoce de bezerros vem sendo considerada como estratégia de prevenção da doença (KIMMAN et al., 1988; SIVULA et al., 1996; ASSIÉ; SEEGER; BEAUDEAU, 2004; PLATT et al., 2009; SCHELCHER, 2012).

No entanto, a adoção da vacinação envolve um investimento que deve ser considerado a luz de dois gargalos. O primeiro limitante refere-se à idade e à via de administração adequada para uma resposta vacinal eficiente (WEST et al., 2000; GRELL et al., 2005; ELLIS et al., 2007; VAN DER SLUIJS; KUHN; MAKOSCHEY, 2010; XUE et al., 2010), e o segundo, ao tipo de vacina disponível no Brasil, que difere das comercializadas e validadas em sistemas de produção de outros países.

Dessa forma, o esclarecimento da influência etária na resposta imune de bezerros já demonstrada por Batista et al. (BATISTA et al., 2012) fundamenta a hipótese que variações etárias também interfiram na resposta vacinal.

2.1 COMPLEXO DOENÇA RESPIRATÓRIA DOS BOVINOS

O CDRB consiste de entidade clínica única de broncopneumonia, no entanto possui etiologia multifatorial, com comprometimento das defesas do hospedeiro aumentando sua susceptibilidade a infecções por microrganismos oportunistas (GONÇALVES et al., 2000; AMES; BAKER; WIKSE, 2006; ACKERMANN; DERSCHIED; ROTH, 2010; CASWELL, 2014). Em bezerros de raças de leite, o CDRB é denominado pneumonia enzoótica e é mais comum em bezerros criados em sistemas de confinamento. Por sua vez, em bezerros de raças de corte, é mais conhecido como “febre do transporte” devido à sua alta incidência após carregamento para operações de recria ou confinamentos (AMES; BAKER; WIKSE, 2006).

O CDRB possui etiologia multifatorial e parece ser precedido por um desequilíbrio na tríade de interação entre um ou mais agentes causais, o sistema de defesa do hospedeiro e fatores ligados ao ambiente e ao manejo (BOWLAND; SHEWEN, 2000). Dentre os principais agentes infecciosos causadores do CDRB, estão o VSRB, o PI-3, o HVB-1 e o VDVB, que podem atuar sinergicamente ou com bactérias, como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma bovis* (BABIUK; LAWMAN; OHMANN, 1988; BAKER, 1995).

A vulnerabilidade do sistema imune secundária a fatores estressantes, como superlotação, mistura de lotes de diferentes faixas etárias, estresse térmico, alimentação deficiente ou bruscamente modificada, infecção parasitária e desmame, propicia a infecção viral e bacteriana (GONÇALVES, 2009). Adicionalmente, a anatomia do pulmão bovino contribui para a instalação de doenças infecciosas, já que não existe ventilação colateral interalveolar e interbronquiolar, o que aumenta a taxa de ventilação e resulta em forte resistência ao fluxo de ar no interior das vias aéreas inferiores (LEKEUX, 1995).

A doença está presente nos mais importantes centros de produção de bovinos, como em países da América do Norte (TAYLOR et al., 2010), Austrália (CUSACK; MCMENIMAN; LEAN, 2003), Nova Zelândia (FASTIER; HANSEN, 1966; DURHAM; FORBES-FAULKNER, 1975), países da Europa (LEKEUX, 1995), Argentina (MIRANDA, 2014) e Uruguai (GUARINO et al., 2008). No Brasil, o CDRB está difundido por todo o país ocasionando prejuízo considerável em virtude da perda expressiva de bezerros, pois além da sua morte comprometer as taxas de reposição,

impede o retorno do investimento na sua concepção e nascimento (GONÇALVES et al., 1993; GONÇALVES, 2009).

2.2 RESPOSTA IMUNE

O meio ambiente apresenta uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos que na luta pela sobrevivência, muitos utilizam o organismo animal como fonte de nutrientes e local de abrigo tentando, dessa forma, invadir os tecidos do hospedeiro. Essa invasão é evitada ou controlada pelas defesas imunológicas, arquitetando uma resposta que resultará desde a higidez até os diversos graus de severidade da doença (MURPHY, 2014; TIZARD, 2014).

As defesas do organismo são mediadas por barreiras físicas, imunidade inata e imunidade adquirida. As barreiras físicas são aquelas que impedem a penetração dos microrganismos invasores e são imprescindíveis para a proteção bem sucedida. No trato respiratório, os mecanismos de defesas físicas incluem os processos de “autolimpeza”, como tosse, espirro e o fluxo de muco no trato respiratório (LEACH et al., 2013; TIZARD, 2014).

Apesar das barreiras físicas serem essenciais, elas são insuficientes para evitar as infecções, as quais são bloqueadas também pelo sistema imune inato caracterizado por mecanismos celulares e químicos de resposta rápida (PRINGLE et al., 1988; BARROS et al., 1994; GONÇALVES et al., 2004; BENESI et al., 2012).

O organismo animal é capaz de centralizar seus mecanismos de defesa inata nos locais de infecção, estabelecendo um complexo de reações denominado inflamação (TAYLOR; THOMAS; STOTT, 1989; GRIFFIN et al., 2010). Durante esse processo, as alterações teciduais provocadas pelo patógeno resultam em elevado fluxo sanguíneo de neutrófilos e monócitos, macrófagos intersticiais, células dendríticas, enzimas do sistema complemento e moléculas antimicrobianas, como a lisozima, que atuam conjuntamente na eliminação de microrganismos invasores. O sistema imune inato é desprovido de memória, portanto as infecções são tratadas de maneira e intensidade semelhantes, independentemente da frequência com que se detecte o patógeno (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2014).

Os macrófagos e neutrófilos estão amplamente distribuídos pelo sistema imunológico e desempenham papel indispensável na homeostase. O macrófago possui perfil multipopulacional no organismo, e no trato respiratório posterior representa a principal defesa celular, seguido dos neutrófilos (LOHMANN-MATTHES; STEINMULLER; FRANKE-ULLMANN, 1994; ACKERMANN; DERSCHIED; ROTH, 2010).

O perfil multipopulacional dos macrófagos é caracterizado pela sua diferenciação fenotípica polarizada pelo microambiente para montar programas funcionais específicos, o que os classifica em dois principais grupos: macrófagos classicamente ativados ($M\phi_1$) que ficam quiescentes no tecido hígido, apresentando o fenótipo $M\phi_1$ somente quando há secreção de citocinas inflamatórias como interferon-gamma (IFN γ) e cujo estímulo ativador é o lipopolissacarídeo (LPS). Participam das fases iniciais da inflamação e possuem alta atividade de metabolismo oxidativo. Os macrófagos alternativamente ativados ($M\phi_2$) estão presentes nas fases finais da inflamação. São responsáveis pela reparação tecidual, limitando a resposta inflamatória por meio da secreção das citocinas anti-inflamatórias. São subdivididos em $M\phi_{2a}$ (após a exposição às interleucinas (IL) 4 ou 13), $M\phi_{2b}$ (imunocomplexos em combinação com IL-1 β ou LPS) e $M\phi_{2c}$ (IL-10, Fator de transformação do crescimento beta (TGF β) ou glicocorticóides) (MARTINEZ et al., 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008; SINDRILARU et al., 2011).

Os neutrófilos, assim como os macrófagos, atuam na fagocitose e metabolismo oxidativo bacteriano, porém são mais eficientes que os macrófagos e liberam produtos reativos que podem causar injúrias teciduais mais intensas (FADEN; OGRA, 1986; DONNELLY; HASLETT, 1992; BURTON et al., 2005). Hoje, os neutrófilos são estudados no campo da biologia celular a fim de se conhecer melhor sua atuação no desvio da resposta imunológica a afecções e sua importância na regulação da resposta imune (TABIASCO et al., 2002; WHALE et al., 2006a, 2006b; WHALE; GRIEBEL, 2009; KUMAR; SHARMA, 2010) e na integração dos sistemas imunes inato e adaptativo (WHALE; GRIEBEL, 2009).

As duas populações celulares, macrófagos e neutrófilos, possuem receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), dentre os quais, os receptores da família do tipo Toll - *Toll like receptors* (TLR) é a mais estudada em bovinos, sendo identificados 10 destes receptores. O receptor *TLR-2* reconhece

peptideoglicanas de bactérias Gram positivas, presentes em *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp, lipoarbinomanose de micobactérias e zimosan fungos. O receptor *TLR-4*, por sua vez, reconhece o lipopolissacarídeo presente na parede das bactérias Gram negativas, como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*, as quais em conjunto com *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp são as bactérias mais envolvidas nos quadros de broncopneumonia em bezerros (GRIEBEL et al., 2005; ACKERMANN; DERSCHIED; ROTH, 2010; GRIFFIN, 2010; BENESI et al., 2013). Diversos receptores *TLR* estão envolvidos em respostas a vírus, inclusive os *TLR-2* e *TLR-4* (BARTON, 2007; BASTO; LEITÃO, 2014; MARIN et al., 2014)

Uma vez reconhecido o patógeno, estes fagócitos ativados englobam as partículas microbianas e liberam grânulos com substâncias microbicidas desencadeando o metabolismo oxidativo (BURTON et al., 2005). Esse processo é protagonizado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo ânion superóxidos, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, dos quais derivam metabólitos oxidantes, direcionados à eliminação dos patógenos internalizados (BURGOS et al., 2011). Embora existam diversas enzimas e grânulos citoplasmáticos envolvidos na eliminação de partículas intracelulares, o metabolismo oxidativo é o mecanismo mais importante, pois é um indicador de defesa contra infecções bacterianas e pode ser usado para investigar a variação entre indivíduos, detectar deficiências funcionais e estudar a resposta a invasores distintos em diferentes tecidos (FORMANT; BABIUKL, 1982; KAMPEN; TOLLERSRUD; LUND, 2004). A atividade reduzida de metabolismo oxidativo tem sido associada com capacidade prejudicada de eliminar bactérias e aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas (CAI et al., 1994; WELSH; ADAIR; FOSTER, 1995; JOHNSTON, 2001), no entanto pode ser prejudicial quando células e tecidos adjacentes são afetados (KLEBANOFF, 1980; ROTH; KAEBERLE; GRIFFITH, 1981; BRIGGS; KEHRLI; FRANK, 1988).

Concomitantemente aos mecanismos de defesa inatos, o sistema imune adquirido se torna efetivo mais lentamente, no entanto eficiente em desenvolver imunidade contra um patógeno, diminuindo a chance de uma reinfecção bem-sucedida pelo mesmo patógeno. A principal diferença entre os sistemas imune inato e adquirido está no fato de que receptores preexistentes do sistema inato são capazes de se ligarem à moléculas e PAMPs comumente encontrados em diferentes microrganismos. Ao contrário, as células do sistema imune adquirido produzem de forma aleatória grande

quantidade de receptores que são estruturalmente únicos. Portanto o sistema imune adquirido consiste em duas grandes linhas de defesa: as proteínas denominadas anticorpos ou imunoglobulinas que são responsáveis pela eliminação dos invasores, caracterizando a resposta humoral, e a outra linha direcionada contra células anormais ou infectadas com microrganismos intracelulares ou endógenos, caracterizando a resposta celular (HALL et al., 1991; TAYLOR et al., 1995; TIZARD, 2014).

As células que representam a resposta imune adquirida, linfócitos T (LT), B (LB) e células *Natural Killer* (NK), tem origem de progenitoras linfoides provenientes de células tronco pluripotentes. As células que vão se diferenciar em LT deixam a medula óssea e migram para o timo, onde ocorre todo o processo de seleção e maturação. Apenas os LT maduros deixam o timo e caem na circulação. As células, que vão se diferenciar em LB, permanecem na medula óssea e, ao final de sua maturação, deixam a medula e entram na circulação, migrando para os órgãos linfoides secundários (TABIASCO et al., 2002; DASHTSOODOL et al., 2008; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos nos LB são as imunoglobulinas que participam da defesa específica do pulmão (LIGGITT, 1985). Os principais isotipos de imunoglobulinas (Ig) encontradas no trato respiratório são IgA, IgM, IgG1 e IgG2. A IgA está relacionada com neutralizações virais, de enzimas e de toxinas, e impede a aderência do patógeno à mucosa, sendo a imunoglobulina mais abundante no trato respiratório (KALINA; WOOLUMS; GERSHWIN, 2005; BERTAGNON et al., 2007). A IgG opsoniza a bactéria facilitando sua destruição (CHASE; HURLEY; REBER, 2008; TIZARD, 2014), enquanto que seu isotipo IgG1 está relacionado com resposta do tipo Th2 e auxilia aglutinando partículas de antígeno, e o isotipo IgG2 é compatível com resposta padrão Th1 auxiliando função neutrofílica (BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999; KIDD, 2003). A IgM é a primeira imunoglobulina a ser produzida durante a resposta imune adquirida e atua ativando o sistema complemento e auxiliando a opsonização e neutralização viral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2014).

Recentemente tem sido destacado o potencial dos LB em desempenhar suas funções após ativação de outros receptores relacionados à resposta imune inata, tais como os *TLR*. Foi demonstrado que os LB expressam a maioria dos *TLR*, tais como *TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-5* *TLR-7* e *TLR-9*, respondendo a uma enorme variedade de ligantes

que podem ser proteicos, polissacarídicos, lipídicos e outros (GRIEBEL et al., 2005; GRAY; GRAY; BARR, 2007). A resposta dos LB a antígenos peptídicos requer a ajuda dos LT auxiliares e esses antígenos são, por isso, denominados “antígenos T dependentes”. Muitos antígenos não proteicos, com epítomos repetitivos, não necessitam da cooperação dos LT e são denominados “antígenos T independentes” (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

O processo de maturação dos LT acontece no timo e envolve a expressão de um receptor de células T (TCR) funcional e dos grupos de diferenciação (CD) CD4 e/ou CD8. Eventualmente, a liberação prematura (JIMÉNEZ et al., 2002; OVERGAARD et al., 2015) ou em resposta a algumas doenças pode ocasionar em células sanguíneas (ORTOLANI et al., 1993; WEISS et al., 1998; NASCIMBENI et al., 2004; BABA et al., 2012) ou teciduais (TABATA et al., 1996; PENTTILÄ et al., 1998) apresentadoras de ambos co-receptores de forma que serão células T $CD4^+CD8^+$.

Os LT só reconhecem antígenos processados apresentados por moléculas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. O TCR é expresso na membrana dos LT em associação com o complexo denominado CD3, composto por cinco diferentes proteínas da família das imunoglobulinas. O TCR é responsável pelo reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC, e o CD3, pela sinalização celular subsequente (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Classicamente os dois principais subtipos de LT efetores são os auxiliares (Th) e os citotóxicos, que apresentam um receptor TCR $\alpha\beta$ e as moléculas correceptoras, CD4 ou CD8, respectivamente. Os LT CD4 (Th - *T helper*) são responsáveis por orquestrar outras células da resposta imune na erradicação patógenos e são também muito importantes na ativação dos LB, macrófagos ou mesmo LT CD8. Os LT CD8 estão envolvidos principalmente nas respostas antivirais e possuem também atividade antitumoral. Ambos os subtipos apresentam papel muito importante no controle de patógenos intracelulares (GRAHAM et al., 1991; THOMAS et al., 1996; ROMÁN et al., 1997; PARKIN; COHEN, 2001; SANDBULTE; ROTH, 2002; KELLING, 2004)

Os LTh são subdivididos funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Na dependência de citocinas presente produzidas por uma célula apresentadora de antígeno mediante um estímulo, um linfócito precursor Th0 pode se tornar um linfócito Th1, Th2 ou Th17. Embora morfologicamente indistinguíveis essas

células apresentam distintos padrões de citocinas secretadas e, consequentemente, diferentes respostas efectoras. Assim, a resposta imune é dirigida ao tipo de resposta que é requerida para lidar com o perfil do patógeno encontrado, ou seja, respostas mediadas por células (Th1) para patógenos intracelulares ou respostas humorais (Th2) contra patógenos extracelulares (ROUSE et al., 1977; BRADLEY, 2003).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular que atuam na comunicação intercelular. São produzidas e secretadas por células do sistema imune, das quais os linfócitos e macrófagos representam os principais produtores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2014). De maneira simplificada, as citocinas podem ser classificadas como pro-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As pro-inflamatórias maximizam diferentes etapas na resposta imunológica, implicando-se as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e o INF γ . As anti-inflamatórias atuam em processos alérgicos (IL-4, IL-5, IL-10) e imunomodulares (IL-10, IL-13, IL-19 e TNF γ) (GOODBOURN; DIDCOCK; RANDALL, 2000; VARELA; FORTES, 2001).

Outros subtipos de LT efetores, encontrados especialmente nas barreiras de mucosa e na pele, são os LT $\gamma\delta$. Essas células são importantes nas respostas imunes contra antígenos comumente encontrados nesses sítios anatômicos e representam um elo entre a resposta imune inata e adaptativa (PARKIN; COHEN, 2001)

Os LT $\gamma\delta$ representam 60% dos mononucleares sanguíneos em bezerros neonatos e são substituídas gradativamente por células B (CD21⁺) e Th (CD4⁺). A função dessas células, apesar de não ser totalmente esclarecida, parece estar envolvida com a integração entre a resposta imune inata e a adaptativa, além do reconhecimento de antígenos não protéicos. As células $\gamma\delta$ podem ainda expressar o fenótipo WC11, considerado população inflamatória, e o CD1, regulatório (KAMPEN et al., 2006; ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Por último, os LT reguladores estão associados à manutenção da autotolerância imunológica e no controle das respostas autoimunes. Assim, há grande interesse no estudo dessas células e de sua potencial aplicação no tratamento das doenças autoimunes (CRUVINEL et al., 2008). As células com função imunorreguladora apresentam como característica básica a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras, como IL-4, IL-10 e TGF β . Atuam em uma complexa rede de mecanismos reguladores destinados a assegurar a modulação das respostas

imunológicas frente aos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, aloantígenos, autoantígenos e alérgenos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

2.3 MATURIDADE IMUNE

A maturidade imunológica geral evolui gradualmente favorecendo a maior susceptibilidade a doenças nos primeiros 30 dias de vida de bezerros (BENESI, 1993). O principal desafio desta fase é a adaptação do recém-nascido à vida extrauterina por meio de mecanismos fisiológicos, entre eles, o sistema imune coordenado por células, tecidos, órgãos e moléculas para a eliminação de agentes estranhos ao sistema, com a finalidade de manter a homeostasia (HAUSER; KOOB; ROTH, 1986; WONG; YEATES, 1990; YEO et al., 1993).

Apesar de todos os componentes essenciais do sistema imunológico estarem presentes em recém-nascidos no nascimento, muitos dos componentes não são totalmente funcionais até, pelo menos, 2 a 4 semanas de idade e podem continuar a desenvolver até a puberdade (REBER et al., 2006).

A produção de progesterona, prostaglandina E2, e citocinas (por exemplo, IL-4 e IL-10) pela placenta suprime as respostas mediadas por células (Th1). Em contraste, estes mediadores promovem a resposta Th2 e a produção de anticorpos (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002).

A evolução progressiva da maturidade imune foi considerada máxima na puberdade, por volta dos seis meses de idade (SCHELCHER, 2012). Cortese (2009) afirmou que a maturidade ocorre entre o quinto e oitavo mês de vida dos bezerros.

Segundo Schelcher (1997), durante os primeiros meses de vida, ocorre a oscilação de subpopulações de linfócitos no sangue e provenientes de lavado broncoalveolar (LBA) avaliados por imunofenotipagem. A concentração de células B no sangue parece aumentar cinco vezes entre o nascimento e o primeiro mês de vida (ABELLA-BOURGES, 1994; KAMPEN et al., 2006) contudo, a resposta de células T parece ser reduzida nesse período (FOSSUM; LARSSON; MATSSON, 1986; NAGAHATA et al., 1991).

Apesar disso, bezerros de um mês de idade demonstraram capacidade para ativar resposta imune local. Constatou-se nestes, o aumento dos teores de imunoglobulinas na

região broncoalveolar, por uma produção local ativa ou transferência seletiva a partir do soro conforme o trato respiratório foi submetido a desafio ambiental (BERTAGNON et al., 2007).

Agregando o estudo anterior, Kalina, Woolums e Gershwin (2005) avaliaram os níveis de anticorpos (IgG1, IgG2 e IgA) no LBA de bezerros entre o primeiro e o segundo mês de idade vacinados contra VSRB inativado com formalina. Estes autores referiram que os animais vacinados tinham níveis significativamente mais elevados de IgG1-VSRB específica no LBA antes da infecção, indicando que a presença prévia do anticorpo no pulmão correspondeu a uma maior proteção após desafios.

Platt et al. (2009) concluíram que vacinas virais atenuadas contendo VSRB, VDVB tipos 1 e 2, HVB e PI-3 induziram resposta principalmente celular mediada por LT após exposição ao vírus, quando administradas no primeiro mês de vida de bezerros. Enquanto que Grell et al. (2005) e Antonis et al. (2010) observaram maior produção de anticorpos específicos e migração de neutrófilos mais intensa no pulmão após desafio intranasal com cepa de VSRB em animais mais velhos, entre um mês e meio a dois, do que em neonatos.

Para que o animal possa ser capaz de combater uma infecção, as células não só devem estar presentes, mas também ativas funcionalmente (PAAPE et al., 2003; NAUSEEF; CLARK, 2010; GONÇALVES et al., 2011). A resposta neutrofílica já é efetiva desde o primeiro mês de vida, porém a produção de espécies reativas de oxigênio apresenta um aumento contínuo até o quarto mês de vida de bezerros (KAMPEN et al., 2006; COSTA et al., 2008). Foi demonstrado, que a maturação de fagócitos mononucleares alveolares aumentou até a terceira semana de vida de bezerros quando os valores de fagocitose de bactérias foi maior, e a partir desse momento os valores decresceram (BATISTA et al., 2012).

2.4 VACINAS DISPONÍVEIS

Existem mais de 80 vacinas comercialmente disponíveis no mundo contra agentes associados ao CDRB. São classificadas de acordo com sua composição que pode variar entre: a) agentes virais vivos modificados (*MLV*) contendo somente um ou

os quatro vírus VSRB, VDVB, HVB e PI-3; b) vírus mortos contendo um a quatro dos vírus; c) combinação de vírus morto com *MLV* contendo três ou quatro vírus; d) vacinas combinadas com dois a quatro vírus com uma ou mais cepas bacterianas; e) combinação de vírus respiratório com reprodutivo; f) composição de sobrenadante e extrato de superfície de bactérias; g) bacterinas (BOWLAND; SHEWEN, 2000; VALARCHER; HÄGGLUND, 2012; MERCK, 2015). Todas as indicações de administração são pela via intramuscular ou subcutânea, com exceção de três delas que são preconizadas a via intranasal, uma contendo somente o HVB-1 e PI-3, outra contendo as bactérias *P. multocida* e *M. haemolytica*, e outra contendo os vírus VSRB, VDVB-1 e 2, HVB-1 e PI-3 vivos modificados, porém não disponíveis no Brasil. No país estão acessíveis somente as vacinas descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Vacinas atualmente disponíveis contra agentes associados à Doença Respiratória Bovina

Produto	Empresa	Agentes	Via
CattleMaster 4	Zoetis	Amostras vivas de HVB-1, PI-3 e VSRB e morta de VDVB	IM
CattleMaster 4 + L5	Zoetis	Amostras vivas quimicamente alteradas de HVB-1 e PI-3 associado com amostra viva modificada de VSRB, mais o diluente composto de combinação inativada de amostras citopáticas e não citopáticas do VDVB e culturas inativadas dos cinco sorotipos de <i>Leptospira</i>	IM
CattleMaster GOLD FP 5/L5	Zoetis	Amostras vivas quimicamente alteradas de HVB-1 e PI-3 associado com amostra viva modificada de VSRB, mais uma preparação líquida e com adjuvante do VDVB (tipos 1 e 2) inativado e culturas inativadas dos cinco sorotipos de <i>Leptospira</i>	SC
Hiprabovis 4	Hipra	Amostras inativadas de HVB-1, PI-3, VDBV e viva de VSRB	IM/ SC

Fonte: (SINDAN, 2016)

IM: intramuscular; SC: subcutânea

2.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

As vias mais usuais de vacinação são intramuscular e subcutânea, ideais para se evitar doenças em que a imunidade sistêmica é a principal, entretanto, existem casos em que a imunidade local deve ser preconizada, se adequando a administração da vacina em sítios de potenciais invasões, como a via intranasal para doenças do sistema respiratório (TIZARD, 2014).

As vacinas *MLV* contra os vírus *VDVB*, *HVB*, *PI-3* e *VSRB* estão comercialmente disponíveis para a prevenção e controle de infecções associadas a esses vírus (DHEIN; GORHAM, 1986; ELLIS et al., 2007; MEYER; DEPLANCHE; SCHELCHER, 2008; WOOLUMS et al., 2013) e a sua maioria tem indicação de administração por via subcutânea ou intramuscular, e são capazes de induzir proteção imunológica contra os vírus, assim como o controle de doenças respiratórias associadas a esses vírus (XUE et al., 2010; SILVA, 2015). Dentro do programa de imunização atual para a maioria dos produtores de gado, as vacinas com *MLV* são utilizadas por via parenteral em bovinos de três a seis meses de idade, quando a imunidade materna proveniente da ingestão do colostro diminui a tal ponto que pode não interferir sobre a imunização (XUE et al., 2010; BACCILI et al., 2015)

No entanto, estratégias de vacinação de mucosas contra antígenos causadores do CDRB têm sido relatadas e mostraram ser eficazes apresentando vantagens em relação às que utilizam a via parenteral. Os resultados obtidos com a utilização da imunização intranasal (mucosa) indicam que esta via é capaz de preparar com sucesso o sistema imune do bezerro jovem mesmo quando na presença de anticorpos maternos (WOOLUMS et al., 2004; ELLIS et al., 2007). Além disso, os antígenos absorvidos por via mucosa são mais propensos a prevenir a infecção (WEST et al., 2000; PLATT et al., 2009). Isto é especialmente verdadeiro para *HVB*, *PI-3* e *VSRB*, uma vez que estes vírus infectam e replicam em células epiteliais de mucosa (GONÇALVES et al., 1993; HICKEY; DRENNAN; EARLEY, 2003).

Para proteger o corpo, um mecanismo de defesa bem equipado está presente na pele e ao longo de muitos revestimentos de mucosas: tecido linfoide associado à pele e de tecido linfóide associado à mucosa (MALT), respectivamente (KUPER et al., 1992; LIEBLER-TENORIO; PABST, 2006).

De acordo com as características anatômicas e fisiológicas das diferentes mucosas, o MALT pode ainda ser específico para o tecido linfoide associado ao intestino, MALT-gástrico, NALT, tecido linfoide associado à laringe, tecido linfoide associado à traqueia, tecido linfoide associado aos brônquios, tecido linfoide associado à conjuntiva, tecido linfoide associado ao ducto salivar, tecido linfoide associado ao ducto lacrimal, e tecido linfoide associado ao vascular (CASTELEYN, 2010).

Em bovinos, o NALT foi descrito pela primeira vez em 1992 (SCHUH; OLIPHANT, 1992), encontrado na entrada da faringe e equivalentes ao anel de Waldeyer em humanos (REBELATTO; MEAD; HOGENESCH, 2000).

O antígeno em contato com a superfície linfóide estimula a produção de linfócitos T e B. Embora os sítios efetores sejam constituídos principalmente por lâmina mucosa, estroma de glândulas exócrinas e epitélio de superfície, são locais onde anticorpos e células do sistema imunológico desempenham ação específica (BRANDTZAEG et al., 2008; WANG et al., 2014)

Dessa forma, o NALT tem sido considerado como local interessante para a apresentação de antígenos vacinais por meio da vacinação intranasal a fim de induzir imunidade específica ao antígeno tanto na cavidade oral, como no trato respiratório (TANAKA et al., 2007; KAVANAGH et al., 2013; LAMICHHANE; AZEGAMIA; KIYONOA, 2014). Bovinos infectados com o vírus da Febre Aftosa (*Aphthae epizooticae*) mostraram a expressão aumentada do receptor de tipo Toll-4 em NALT, indicando a importância do IFN tipo I em respostas NALT contra a doença (ZHANG et al., 2006).

O estudo do NALT em bovinos e os mecanismos de indução da resposta imune nesse tecido linfóide, foi sugerido como recurso para a possibilidade de formular uma estratégia de vacinação intranasal que maximiza a resposta imunológica de mucosa e sistêmica contra patógenos respiratórios (REBELATTO; MEAD; HOGENESCH, 2000)

2.6 RESPOSTA VACINAL

Embora os princípios da vacinação sejam conhecidos há muitos anos, as vacinas e os procedimentos para vacinação estão em constante evolução, uma vez que buscamos melhorias na sua eficácia e segurança. As primeiras vacinas veterinárias frequentemente apresentavam eficácia limitada e induziam efeitos adversos graves, mas considerados aceitáveis quando comparados aos riscos de se contrair a doença. Deve-se sempre assegurar que os riscos da vacinação não excedam àqueles associados às chances de se contrair a própria doença (MARTIN et al., 1980; ROTH; KAEBERLE, 1983; RIDPATH; BOLIN, 1995; STRASSER et al., 2003; RIDPATH, 2013; TIZARD, 2014).

Os mecanismos gerais de resposta imune à vacinação têm sido alvo de revisões (DHEIN; GORHAM, 1986; LAMBERT; LIU; SIEGRIST, 2005; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; STOKKA; GOLDSMITH, 2015) e livros (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2014).

A resposta imunológica de um animal à vacinação é semelhante a sua resposta à doença viral natural e envolve tanto aspectos específicos como inespecíficos do sistema imune, sendo o inespecífico em parte representado por células fagocíticas tais como neutrófilos e macrófagos. Os macrófagos são responsáveis pelo processamento do antígeno vacinal antes da apresentação às células responsáveis pela imunidade específica. O sistema imune específico envolve dois tipos de células, LB e LT, porém há substancial interdependência entre os dois tipos de células e entre os sistemas imunes específico e não específico (DHEIN; GORHAM, 1986; SIEGRIST, 2008; AMANNA; SLIFKA, 2011; DOU et al., 2015).

O revestimento da mucosa é a primeira barreira e parte do sistema imune inato, porém quando esta barreira é rompida já que as células que revestem a mucosa têm como principais funções absorção e secreção, outros mecanismos são envolvidos. Células sentinelas do sistema imunológico próximas à invasão, como macrófagos e neutrófilos, reconhecem os patógenos por meio dos TLR e alertam o sistema imunitário adaptativo que um antígeno foi detectado. Uma vez que um antígeno é detectado e fagocitado, o processo interno é iniciado. O antígeno é apresentado a células T auxiliares (Th1, Th2) via receptores do MHC para dirigir a resposta imune. Em animais sem prévia exposição esta função é impulsionada principalmente por células dendríticas que são capazes de apresentar antígenos por meio tanto de receptores MHC I como II. A definição de qual receptor MHC e tipo celular (Th1, Th2), vai resultar em qual resposta imune será conduzida: resposta mediada por células, resposta humoral, ou ambas as respostas efectoras (HUSSELL; OPENSHAW, 1998; HOLLING; SCHOOTEN; VAN DEN ELSEN, 2004; STOKKA; GOLDSMITH, 2015).

As infecções virais e vacinas destinadas a induzir uma resposta imune protetora devem conduzir a resposta Th1, uma vez que os vírus são intracelulares, e portanto uma resposta desviada para o padrão Th2 pode ser prejudicial (GERSHWIN, 2012). No entanto, a produção hormonal e de citocinas anti-inflamatórias pela placenta suprime as respostas mediadas por células (Th1), promovendo a resposta humoral (Th2) para produção de anticorpos (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002).

Estratégias de vacina capazes de contornar o desvio Th2 neonatal têm sido estudadas por meio da utilização de adjuvantes de baixa toxicidade desenvolvidos para induzir fortes respostas Th1 (BARRIOS et al., 1996; MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002).

Nesse ponto, as vacinas administradas pelas vias intranasal ou oral induzem a produção de IgA local via NALT e o desenvolvimento de imunidade mediada por células específicas nos tratos respiratório e gastrointestinal, respectivamente. A IgA local protege contra a invasão de agentes infecciosos e é um benefício significativo em doenças que envolvem principalmente estas áreas (DHEIN; GORHAM, 1986; KIMMAN; WESTENBRINK; STRAVER, 1989; HALL et al., 1991; HERITAGE et al., 1997, 1998; ANDOH et al., 2002; HISHIKI et al., 2004).

O foco principal dos programas de saúde preventiva em bezerros jovens é a utilização de vacinas respiratórias para estimular respostas imunes protetoras. Um calendário de vacinação comum para bezerros é administrar a vacina viral respiratória juntamente com um componente bacteriano (STEP et al., 2008).

Assim, estratégias de vacina podem incluir até 10 diferentes antígenos dados simultaneamente, o que incita à seguinte pergunta: todos os animais dentro de um grupo são capazes de responder igualmente a esse número de antígenos incorporados ao mesmo tempo ou determinados antígenos interferem ou afetam negativamente a resposta aos outros antígenos administrados? (LIU; LEHMKUHL; KAEBERLE, 1999; MAWHINNEY; BURROWS, 2005; STOKKA; GOLDSMITH, 2015).

Dentre os antígenos vacinais, bactérias associadas ao CDRB como *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*, e ainda *Clostridium fetus* e sorovares de *Leptospira* são componentes de algumas vacinas utilizadas na prevenção do CDRB (BOWLAND; SHEWEN, 2000). Estudos têm demonstrado a importância da leucotoxina (Lkt) na patogênese e a correlação entre a presença de anticorpos anti-Lkt no soro e proteção contra a pneumonia, apesar de sugerirem que a presença dos anticorpos não é suficiente por si só para proporcionar imunidade (SHEWEN; WILKIE, 1988; JEYASEELAN; SREEVATSAN; MAHESWARAN, 2002).

Baseado nisso, a vacinação intranasal foi ligada a mudanças significativa na Lkt IgA específica em secreções nasais de bezerros de quatro semanas utilizando complexo imuno estimulante (ISCMS), o que é particularmente importante dada a correlação entre IgA nasal, Lkt e proteção (SHEWEN et al., 2009). Tal aspecto, chama a atenção

sobre a influência do tipo de adjuvante utilizado na vacina com a resposta vacinal, no qual o composto Quil-A formador do adjuvante tipo *ISCOM* tem sido considerado atraente por promover respostas tanto via anticorpos como celulares numa variedade de modelos animais experimentais e humanos (KENSIL, 1996; NORDENGRÄHN et al., 1996; SASAKI et al., 1998; SMITH et al., 1999; SPICKLER; ROTH, 2003; HÄGGLUND et al., 2004; SANDERS et al., 2005; COFFMAN; SHER; SEDER, 2010).

Em todos os animais após a vacinação, há expansão nas populações clonais de células T e B (Figura 1). Os requisitos de uma boa resposta imune são que esta expansão clonal pare e que um processo ativo de morte celular (apoptose) ocorra. Este processo permite o descarte de células possivelmente pouco responsivas ou até mesmo causadoras de autoimunidade (WAGNER, 2007). Todo o processo de vacinação para atingir a homeostase leva pelo menos três semanas para o desenvolvimento de uma resposta primária, que pode então ser impulsionado para se obter uma resposta secundária satisfatória (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Figura 1 - A importância do sincronismo vacinal e a resposta ao reforço

FONTE: Adaptado de Chase, Hurley e Reber (2008)

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo buscou comparar a resposta imune humoral e mediada por células, local e sistêmica, entre bezerros primovacinados intranasalmente aos 15 e 45 dias de vida com vacina polivalente contendo vírus sincicial respiratório bovino vivo modificado, cepas quimicamente alteradas de herpesvirus bovino tipo 1 e vírus da parainfluenza tipo 3, e vírus inativado da diarreia viral bovina tipos 1 e 2, além de culturas inativadas dos cinco sorotipos de *Leptospira* spp e adjuvante Quil-A.

Objetivos Específicos

- Avaliar a interferência da vacinação intranasal no estado geral dos bezerros de diferentes idades, por meio de exame físico, hemograma e broncoscopia;
- Comparar a dinâmica da resposta à vacinação intranasal em diferentes idades sobre a quantificação das populações leucocitárias no sangue e no LBA, capacidade fagocítica e microbicida em células CD14⁺ sanguíneas e no LBA, e em leucócitos CH138⁺ sanguíneos;
- Investigar a influência da vacinação intranasal na imunidade humoral por meio de detecção de anticorpos específicos no sangue dos animais de diferentes idades.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, em 28 de novembro de 2012, protocolado sob o nº 2799/2012.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 16 bezerros machos, da raça Holandesa, sadios e provenientes de duas propriedades próximas à cidade de São Paulo. Os animais receberam na propriedade cerca de 2 litros de colostro da própria mãe em mamadeira até 6 horas após o nascimento e foram encaminhados a FMVZ de 12 a 48 horas após o nascimento.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO AMOSTRAL

Foi utilizada como critério de inclusão amostral a adequada transferência de imunidade passiva, baseado nos valores de proteína sérica total (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e teste de aglutinação por glutaraldeído com soro sanguíneo (CHARLES; CAMPOS; LIZIERE, 1994).

Para inclusão, era realizado o hemograma (BIRGEL, 1982), e os animais eram submetidos ao exame físico (DIRKSEN; GRUNDER; STOBER, 1993) antes de entrar no experimento, com avaliação do estado geral do animal, e aferição dos parâmetros de frequências cardíaca e respiratória, temperatura, motilidade intestinal, coloração de mucosas e palpação de linfonodos. Caso alguma alteração fosse encontrada, o animal era excluído.

4.3 VACINA

Foi utilizada a vacina¹ polivalente composta por uma preparação liofilizada de cepas quimicamente alteradas, termossensíveis, do HVB-1, PI-3 e VSRB vivo modificado, mais uma preparação líquida e com adjuvante Quil-A de VBVD tipos 1 e 2 inativados e culturas inativadas dos cinco sorotipos de *Leptospira* (*canicola*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae* e *pomona*), comercialmente disponível no Brasil semelhante a utilizada por Ellis et al. (2007); Ellis, Gow e Goji (2010) e Woolums et al. (2013).

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo aleatório, onde 16 bezerros foram mantidos em baias individuais e acompanhados desde um a dois dias de idade (d) até 87 d. A limpeza e desinfecção do local eram realizadas diariamente e repetida sempre que necessário, com a utilização de solução de hipoclorito (10 %) e formaldeído (7,99 %). Durante o dia os animais permaneciam soltos em local cimentado e com incidência de sol (Figura 2) e à noite eram alocados em baias individuais ou em duplas com cama de maravalha.

Figura 2 - Espaço reservado para os bezerros durante o dia - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

¹ CattleMaster Gold®, Zoetis.

A partir do dia que chegaram na FMVZ, os bezerros foram adaptados à dieta por meio da administração de colostro congelado e leite em pó². No primeiro dia, os animais receberam dois litros de colostro aquecido em banho-maria a temperatura média de 60 °C duas vezes ao dia (BITTAR; FERREIRA, 2006). Nos dias subsequentes, era realizada a diluição fracionada de 4:1 (quatro partes de colostro para uma de leite); 2:1; 1:1; 0,5:1 e finalmente o leite puro. Os animais receberam dois litros leite e ração³ para bezerros duas vezes por dia, e água *ad libitum*. A partir da oitava semana de vida, eles foram desmamados e alimentados com feno de tifton, 700 g a 1 kg de ração duas vezes por dia e sal mineral⁴.

Os animais foram alocados em três grupos, conforme o quadro 2, cada um com cinco animais, sendo o grupo controle, composto de animais que não foram imunizados, e os grupos A (GA) e B (GB) compostos por animais que foram vacinados em idades distintas. Ambas as vacinações foram prematuras, no entanto um protocolo foi iniciado aos 15 dias de vida e o outro aos 45 dias. Os momentos do grupo controle serviram de parâmetro para os três momentos dos grupos GA e GB (Figura 3). O primeiro momento dos animais do grupo controle foi aos 15 dias de vida, sendo os momentos subsequentes definidos de acordo com as idades dos grupos GA e GB.

Os bezerros dos grupos GA e GB receberam intranasalmente 1 mL da vacina no momento 1 (M1), como realizado por Xue et al. (2010) e Ellis, Gow e Goji (2010), sendo que os animais do GA foram primovacinados aos 15 d, enquanto que os do GB, com 45 d. A segunda dose da vacina (M2) foi realizada 21 dias após a primeira e a terceira e última coleta de GA e GB (M3) aconteceu após 21 dias da segunda dose vacinal. As idades dos bezerros à primeira dose vacinal correspondem àquelas definidas por Ellis et al. (2007). Nos momentos foram realizadas coletas de sangue e de LBA, este obtido por meio de endoscopia.

Quadro 2 - Grupos experimentais - São Paulo – 2013

Controles (CTLA/CTLB) N = 5	GA (aos 15 dias de idade) N = 6	GB (aos 45 dias de idade) N = 5
Sem vacinação	1ª dose vacinal aos 15 dias de idade	1ª dose vacinal aos 45 dias de idade
Sem vacinação	2ª dose vacinal 21 dias após a primeira	2ª dose vacinal 21 dias após a primeira

Fonte: Gomes (2013)

GA: grupo A; GB: grupo B; CTLA: grupo controle de GA; CTLB grupo controle de GB

² Piracanjuba®

³ Geramilk Bezerra®, 40kg - Presence

⁴ Purina Gold® com 30kg - Purina

Figura 3 - Diagrama representativo do experimento - São Paulo – 2013

Fonte: Gomes (2013)

4.4.1 Exame clínico e exame específico do sistema respiratório

Durante o período experimental os animais foram avaliados diariamente pelos métodos semiológicos classicamente preconizados por Dirksen, Grunder e Stober (1993), na qual foram realizadas as avaliações das funções vitais constituídas por frequências respiratória e cardíaca, temperatura corporal, movimentos ruminiais, estado de hidratação, coloração das mucosas aparentes e palpação de linfonodos. Na sequência, estes animais foram submetidos ao exame físico específico do sistema respiratório, empregando-se os seguintes métodos semiológicos: inspeção direta, palpação, percussão e auscultação (GONÇALVES; FEITOSA, 2008) como parte do exame específico do sistema respiratório, foi realizada a inspeção indireta do sistema respiratório de acordo com Batista et al. (2012), por meio de broncoscopia, utilizando um videogastrosκόpio flexível⁵, com 8,2 mm de diâmetro e comprimento de trabalho de 1100 mm, acoplado a uma processadora de imagens com fonte de luz⁶.

De acordo com estudo realizado pela Universidade de Wisconsin, EUA (UW, 2015) foram definidos escores para se avaliar a quantidade de secreção pulmonar encontrada por meio da endoscopia (Quadro 3).

⁵ EG-250PE5, Fujinon®

⁶ System 2200 Processador, Fujinon®

Quadro 3 - Escore de secreção pulmonar de bezerros avaliados por endoscopia – São Paulo – 2013

0	1	2	3
Secreção serosa normal	Pequena quantidade de secreção mucosa	Moderada quantidade de secreção mucosa	Grande quantidade de secreção mucosa ou mucopurulenta

Fonte: Gomes (2013)

4.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram realizadas as coletas de sangue e LBA nos animais do três grupos GA, GB e controle no três momentos experimentais M1, M2 e M3.

4.5.1 Coleta de sangue

A coleta de sangue venoso foi realizada por punção da veia jugular externa, com anti-sepsia prévia, utilizando tubos de coleta à vácuo com anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e heparina) e sem anticoagulante. Com a amostra de sangue com EDTA foi realizado o leucograma (BIRGEL, 1982; WOOD; QUIROZ - ROCHA, 2010), enquanto que o sangue com heparina foi utilizado para a imunofenotipagem linfocítica e função celular. As amostras de sangue sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção do soro sanguíneo para a pesquisa de anticorpos antivirais neutralizantes e específicos e anticorpos antibacterianos.

4.5.2 Coleta de lavado broncoalveolar

O LBA foi obtido por meio de endoscopia, segundo a técnica preconizada por Allen et al. (1992) e Batista et al. (2012). Os bezerros permaneceram por 12 horas em jejum sólido, foram sedados com 0,02 mg/kg de xilazina⁷ por via intramuscular, e contidos em decúbito lateral. O videogastrosκόpio flexível foi introduzido pela narina até a região dos brônquios, pelo qual três alíquotas de 20 mL cada de solução fisiológica 0,9 % estéril, a temperatura

⁷ Rompun®2%, Bayer Sapude Animal

ambiente, foram injetadas pelo canal de trabalho nos brônquios, direito e esquerdo, e posteriormente succionadas por bomba a vácuo.

Após o procedimento, o aparelho logo após ser higienizado interior e exteriormente com produto adequado⁸ conforme indicado pelo fabricante, permanecia submerso por 30 minutos em solução⁹ de ortoftaldeído a 0,55 % para sua completa desinfecção.

4.5.2.1 Isolamento da suspensão celular do LBA

No laboratório, as amostras de LBA foram centrifugadas¹⁰ a 1000 x g por 15 minutos (4 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi armazenado em tubos cônicos e congelado para posterior quantificação de imunoglobulinas. O botão celular, conservado na superfície inferior do frasco, foi removido através de aspersão cuidadosa de aproximadamente 30 mL de PBS¹¹. A centrifugação foi repetida desta vez a 400 x g por 10 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em um mL de meio de cultivo celular (RPMI 1640)¹² enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB)¹³ 10 % (KOESS; HAMANN, 2008).

4.5.2.2 Viabilidade e concentração celular das amostras de LBA

A suspensão celular foi submetida à contagem e viabilidade celular com 80 a 90%, realizada na câmara de *Neubauer*, avaliada pela exclusão do azul de *Trypan*. Em seguida, a suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 células viáveis/mL para a realização das provas imunológicas e citológicas.

⁸ Detergente EnzimáticoRiozyme Gold IV® - Rioquímica

⁹ CIDEX® OPA - Johnson & Johnson

¹⁰ Eppendorf® Centrifuge 5810R

¹¹ *Phosphate Buffered Saline* – Tampão Fosfato Salino

¹² *Roswell Park Memorial Institute* – RPMI 1640 Sigma® R7638

¹³ Vitrocell – Campinas, SP

4.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises laboratoriais consistiram de leucograma, avaliação citológica do LBA, imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos e pulmonares e avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e pulmonares por citometria de fluxo, detecção de anticorpos séricos antivirais neutralizantes e específicos, antibacterianos e mensuração da concentração de IgA no LBA.

4.6.1 Leucograma

O número total de leucócitos por μL foi mensurado por meio de contador automático de partículas¹⁴. A contagem diferencial foi feita por esfregaços sanguíneos corados com corante de Rosenfeld; para a diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico¹⁵, com objetiva de imersão, sendo identificados e contados 100 leucócitos (BIRGEL, 1982).

4.6.2 Avaliação citológica do LBA

As células foram recuperadas de acordo com o protocolo descrito nos itens 4.5.2.1 e 4.5.2.2 Após o ajuste da concentração celular, 200 μL da suspensão foi adicionado na lâmina com suporte. As lâminas foram centrifugadas, utilizando uma citocentrífuga¹⁶, a 28 x g por 6 minutos. As lâminas foram fixadas em Metanol P.A. durante cinco minutos, e coradas com corante de Rosenfeld.

Para a contagem diferencial das células do LBA, utilizou-se um microscópio óptico⁴⁹, e um contador automático Leucotron[®] T-P. Foram contadas 300 células, em um aumento de 1000x com óleo de imersão, diferenciando entre monócitos, macrófagos, macrófagos binucleados, células gigantes, neutrófilos segmentado, linfócitos, basófilos, eosinófilos, de acordo com Gonçalves (1997).

¹⁴ ABC Vet[®] Marca ABX[™] HORIBA, Montpellier, França

¹⁵ Nikon[®] ECLIPSE E200

¹⁶ Cytospin 3 SHANDON[®]

4.6.3 Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e pulmonares

O metabolismo oxidativo foi avaliado por meio da oxidação intracelular de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína¹⁷ (DCFH-DA) em diclorofluoresceína (DCFH) aferindo-se indiretamente a produção intracelular de ERO conforme descrito por Hirabayashi, Tamiuchi e Kobayshi (1985) e Kobzik, Godleski e Brain (1990) (Quadro 3). Para a realização do ensaio da fagocitose com multiplicidade de infecção igual a 120, foi necessária a conjugação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (O98:H28) a iodeto de propídio¹⁸ (PI) conforme Hasui, Hirabayashi e Yohnosuke (1989) e modificado por Souza (2010) e Batista (BATISTA et al., 2012) (Quadro 4).

Os ensaios foram realizados em tubos de polipropileno para citometria de fluxo. Em cada tubo foi adicionado 100 µL de sangue ou de LBA de cada animal e incubado¹⁹ a 37 °C por 30 minutos com 200 µL de 2',7' DCFH-DA (0,3 mM) ou com 100 µL de *Staphylococcus aureus* conjugado a PI (Sa-PI) ou com 100 µL de *Escherichia coli* conjugada a iodeto de propídio (Ec-PI) a concentração de 25×10^6 bactérias/mL.

Após o período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 2.000 µL de solução gelada de EDTA (3 mM), em seguida os tubos foram centrifugados a 250 x g por oito minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante e homogeneizar as amostras, procedeu-se a lise hipotônica das hemácias com solução salina (0,2 % e 1,6 %) e nova centrifugação, em seguida foram adicionados os anticorpos para a identificação das populações leucocitárias avaliadas por citometria de fluxo²⁰.

4.6.4 Imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos e pulmonares

A expressão das moléculas de CD14, CD4 e CD8 foram avaliadas em leucócitos sanguíneos e do LBA e de CH138 e CD3 nos leucócitos sanguíneos por citometria de fluxo, analisando-se 20 mil (sangue) e 10 a 15 mil (LBA) eventos, com a utilização de anticorpos monoclonais anti-CH138, anti-CD14, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 marcados com fluorescência (Quadro 4).

¹⁷ Sigma Aldrich, St. Louis, n° cat. D6883

¹⁸ Sigma Aldrich, St. Louis, n° cat. P4170

¹⁹ Banho-Maria – Modelo 102, Marca Fanen Ltda® - São Paulo – SP.

²⁰ FACSCalibur™ - Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA.

Todos os anticorpos primários e secundários utilizados no experimento foram titulados para otimizar os resultados obtidos. O título inicial foi o recomendado pela empresa fabricante e este, foi sendo diluído da seguinte forma: 1; 1:2; 1:4. Os dados foram adquiridos por citometria e analisados para a determinação do melhor título a ser utilizado.

Inicialmente as células foram incubadas com o anticorpo primário por 30 minutos a temperatura ambiente. Passado o período de incubação, foi realizada a lavagem das células com 1000 µL de tampão fosfato-salino (PBS) gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante foi feita a marcação com anticorpo secundário por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luminosidade. Novamente, foram adicionados 1000 µL de PBS gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 400 µL de PBS e mantidas no escuro para a leitura no citômetro de fluxo.

Quadro 4 - Anticorpos monoclonais primários e secundários por tubo para quantificação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, fagocitose e imunofenotipagem das amostras de LBA no Citômetro de fluxo (FACSCalibur™) - São Paulo – 2013

Calibração	
A - Só células	
B - Células + DCFH	
C - Células + Sa-PI	
D - Células + (CD14-IgG1 ²¹ + PECy-5 ²²)	
E - Células + (CD8-IgM ²³ + APC ²⁴)	
F - Células + (CD14-IgG1 + FITC ²⁵)	
G - Células + (CD4-IgG2 ²⁶ + PE ²⁷)	
Experimento Sangue	Experimento LBA
H - Células + DCFH + (CD14-IgG1 + PECy-5) + (CH138-IgM ²⁸ + APC)	H - Células + DCFH + (CD14-IgG1 + PECy-5)
I - Células + Sa-PI + (CD14-IgG1 + FITC) + (CH138-IgM + APC)	I - Células + Sa-PI + (CD14-IgG1 + FITC)
J - Células + Ec-PI + (CD14-IgG1 + FITC) + (CH138-IgM + APC)	J - Células + Ec-PI + (CD14-IgG1 + FITC)
K - Células + (CD3-IgG1 ²⁹ + FITC) + (CD4-IgG2 + PE) + (CD8-IgM + APC)	K - Células + (CD4-IgG2 + PE) + (CD8-IgM + APC)

Fonte: Gomes (2013)

DCFH - diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína; Sa-PI - *Staphylococcus aureus* conjugado a iodeto de propídio; Ec-PI - *Escherichia coli* conjugada a iodeto de propídio; FITC - Isotiocianato de fluoresceína; PECy5 - Ficoeritrina-Cianina 5; APC - Alofococianina; PE - Ficoeritrina

²¹ Mouse anti-bovine CD14, VRMD, Pullman, EUA n° cat MM61A

²² Life, San Diego, CA, USA, n° cat. M32018

²³ Mouse anti-bovine CD8, VRMD, Pullman, EUA n° cat BAQ111A

²⁴ Life, San Diego, CA, USA, n° cat. M31505

²⁵ Life, San Diego, CA, USA, n° cat. A10530

²⁶ Mouse anti-bovine CD4, VRMD, Pullman, EUA n° cat ILA11A

²⁷ VRMD, Pullman, USA, n° cat. ILA11A

²⁸ Mouse anti-bovine CH138, VRMD, Pullman, EUA, n° cat. CH138A

²⁹ Mouse anti-bovine CD3, VRMD, Pullman, EUA n° cat MM1A

4.6.5 Análise da citometria de fluxo

As leituras das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo³⁰ conectado a um computador³¹ com o programa CELLQUEST®³². Os dados obtidos nas leituras da citometria de fluxo foram analisados em *software* próprio (*Flow Jo*³³).

4.6.5.1 Análise do sangue

Nas amostras sanguíneas, foi desenhado o *gate* de células retirando-se os debris celulares e em seguida, as populações de granulócitos e de mononucleares foram identificadas dentro desse *gate* primeiramente por seu tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e granulosidade (*Side Scatter* - SSC) (Figura 4). Das células caracterizadas como granulócitos foram avaliadas as porcentagens de células que expressaram CH138 (Figura 5) e das células caracterizadas como mononucleares foram avaliadas as porcentagens de células que expressaram CD14 (Figura 6), CD3 (Figura 7), CD4 e CD8 (Figura 8).

Figura 4 - Identificação das populações de granulócitos e mononucleares (direita) a partir do *gate* de células (esquerda) do sangue de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

³⁰ BD FACSCalibur Flow Cytometry® - Becton, Dickinson and Company

³¹ Macintosh Apple, CA, USA

³² Becton Dickinson Immunocytometry Systems™

³³ Treestar – Versão 7.6.1 para Windows.

Figura 5 - Identificação da população de granulócitos CH138⁺ (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) no sangue de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vinho se refere à expressão de CH138 APC⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL4-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 6 - Identificação da população de mononucleares CD14⁺ (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) no sangue de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor verde se refere à expressão de CD14 no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL1-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 7 - Identificação da população de mononucleares $CD3^+$ (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) no sangue de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor verde se refere à expressão de CD3 no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL1-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 8 - Identificação da população de mononucleares $CD4^+$ (R1), $CD4^+CD8^+$ (R2), $CD4^-CD8^-$ (R3) e $CD4^-CD8^+$ (R4) (esquerda) e dos tubos de calibração para os filtros FL2 (direita, acima) e de FL4 (direita, abaixo) no sangue de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

A porcentagem descrita como FL2-H+ e FL4-H+ à direita são referentes às porcentagens de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esses filtros.

Os valores de porcentagem de células marcadas e da intensidade de fluorescência de produção de ERO intracelular e de fagocitose foram obtidos dentro das populações identificadas expressando CH138 no *gate* de granulócitos (Figuras 9, 10 e 11) e CD14 no *gate* de mononucleares (Figuras 12, 13 e 14).

Figura 9 - Identificação da população de granulócitos CH138⁺ sanguíneos de bezerros que produziram espécies reativas de oxigênio intracelular (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor verde se refere à expressão de DCFH no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL1-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro

Figura 10 - Identificação de granulócitos CH138⁺ sanguíneos de bezerros que fagocitaram bactérias *Staphylococcus aureus* (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de *S. aureus*⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 11 - Identificação de granulócitos CH138⁺ sanguíneos de bezerros que fagocitaram bactérias *Escherichia coli* (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de *E. coli*⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H⁺ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 12 - Identificação da população de mononucleares CD14⁺ sanguíneos de bezerros que produziram espécies reativas de oxigênio intracelular (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor verde se refere à expressão de DCFH no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL1-H⁺ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 13 - Identificação da população de mononucleares $CD14^+$ sanguíneos de bezerros que fagocitaram bactérias *Staphylococcus aureus* (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de *S. aureus*⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 14 - Identificação da população de mononucleares $CD14^+$ sanguíneos de bezerros que fagocitaram bactérias *Escherichia coli* (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de *E. coli*⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H+ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

4.6.5.2 Análise do LBA

Nas amostras de LBA, foi desenhado o *gate* de células retirando-se os debris celulares (Figura 14) e em seguida, a identificação de neutrófilos, macrófagos vacuolizados e macrófagos monócitos-*like* dentro desse *gate* foi realizada como anteriormente descrito por Sladek e Rysanek (2010), com algumas modificações. Inicialmente, as células foram diferenciadas em neutrófilos, macrófagos vacuolizados e macrófagos monócitos-*like* pelo tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 15). Após a identificação de cada população de leucócitos, os neutrófilos (CD14⁻) (Figura 16), macrófagos vacuolizados (CD14⁺) (Figura 17) e macrófagos monócitos-*like* (CD14⁺) (Figura 18) foram analisados com base na porcentagem de células marcadas.

Figura 15 - Identificação das populações de neutrófilos (R1), macrófagos vacuolizados (R2) e macrófagos monócitos-*like* (R3) (direita) a partir do *gate* de células (esquerda) do LBA de bezerras - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

Figura 16 - Identificação das populações de neutrófilos CD14⁻ (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) no LBA de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de células CD14⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H⁺ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 17 - Identificação das populações de macrófagos vacuolizados CD14⁺ (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) no LBA de bezerros - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de células CD14⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H⁺ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Figura 18 - Identificação das populações de macrófagos monócitos-like CD14⁺ (esquerda) e calibração da amostra com o tubo branco (direita) no LBA de bezerras - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

No citograma à direita, a cor vermelha se refere à expressão de células CD14⁺ no tubo experimental e a cor cinza, no tubo branco. A porcentagem descrita como FL3-H⁺ é referente à porcentagem de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esse filtro.

Das células caracterizadas como macrófagos vacuolizados foram avaliadas as porcentagens de células que expressaram CD4 e CD8 (Figura 19).

Figura 19 - Identificação de células expressando CD4⁺ (R1), CD4⁺CD8⁺ (R2), CD4⁻CD8⁻ (R3) e CD8⁺ (R4) (esquerda) e dos tubos de calibração para os filtros FL2 (direita, acima) e de FL4 (direita, abaixo) no LBA de bezerras - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

A porcentagem descrita como FL2-H⁺ e FL4-H⁺ à direita são referentes às porcentagens de células no tubo branco que apresentam autofluorescência para esses filtros.

Os valores de porcentagem de células marcadas e da intensidade de fluorescência de produção de ERO intracelular e de fagocitose de *S. aureus* e *E. coli* foram obtidos dentro dos *gates* de neutrófilos CD14⁻, macrófagos vacuolizados CD14⁺ e macrófagos monócitos-*like* CD14⁺ de maneira semelhante ao realizados no sangue.

4.6.6 Detecção de anticorpos

Foi realizada a pesquisa de anticorpos neutralizantes e específicos contra os vírus VSRB, VDBV, HVB e PI-3 e contra 20 sorotipos de *Leptospira*. No LBA, foi mensurada a concentração de IgA total.

4.6.6.1 Anticorpos antivirais neutralizantes

Por meio da técnica de virusneutralização realizada no Laboratório de Viroses dos Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, SP, foi analisada a presença de anticorpos neutralizantes contra o VRSB, VDVB-1, HVB-1 e PI-3 em todos os momentos experimentais.

Amostras de soro e de LBA a serem testadas foram descongeladas, inativadas em banho-maria a 56 °C por 30 minutos, e colocadas em duplicata nas microplacas de 96 poços. Na primeira coluna de cada placa, foram adicionados 100 µL de meio Eagle-MEM em cada poço, e nas demais colunas, 50 µL, excetuando a coluna 3. As amostras em teste foram adicionadas nos poços das colunas 2 (50 µL) e 3 (100 µL). A partir da coluna 3 (diluição 1:2), foi feita a diluição seriada do material até a coluna 12 (diluição 1:1024), e após, 50 µL de suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 TCID₅₀ (50% *tissue culture infective doses*) foram adicionados nesses poços. As microplacas foram incubadas por 60 minutos em estufa com concentração de 5 % de CO₂ à temperatura de 37 °C. Após esse período, foram acrescentados 50 µL de uma suspensão de células MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*), em uma concentração de 3,0 x 10⁵ células/mL, em todos os poços da microplaca. Esta foi novamente incubada nas mesmas condições por um período de 96 horas. Realizada a leitura, a amostra considerada reagente pela presença de anticorpos foi aquela que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2. Amostras pareadas de cada animal foram testadas na mesma microplaca, e o título, expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar as 200

TCID₅₀, foi calculado por meio de média geométrica. Após efetuadas as médias, os valores dos títulos foram transformados em logaritmo (log) de base 10, para melhor visualização dos resultados. Os valores menores que os adquiridos na primeira diluição positiva, foram considerados não reagentes.

4.6.6.2 Anticorpos antivirais específicos

Utilizando-se as amostras de soro sanguíneo foram realizadas as dosagens de imunoglobulinas específicas para VSRB (IgG³⁴ e IgM³⁵), VDVB³⁶, HVB³⁷ e em amostras do LBA foi realizado a dosagem de IgA³⁸ total por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se kits comerciais de acordo como descrito na bula. A diluição utilizada para mensuração da concentração de IgA no LBA foi de 1 : 2.000.

Como os resultados do teste de VSRB-IgG são representados por cruzeiros de acordo com a absorbância, foram definidos escores numéricos para a realização da análise estatística. Dessa forma, o resultado negativo tem escore zero (0); uma cruz (+), escore um (1); duas cruzeiros (++) , escore dois (2) e assim por diante até cinco cruzeiros (+++++), escore cinco (5). Para os resultados de VSRB-IgM, VDVB-1 e HVB-1, adotou-se escore zero (0) para resultados negativos e um (1) para positivos, uma vez que a interpretação dos resultados nesses kits não era em cruzeiros, mas positivo ou negativo de acordo com a absorbância.

4.6.6.3 Anticorpos antibacterianos

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ da Universidade de São Paulo, de acordo com técnica utilizada por Homem et al. (2001).

³⁴ *Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) IgG AntibodyTest Kit®* - Idexx Laboratories

³⁵ *Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) IgM AntibodyTest Kit®* - Idexx Laboratories

³⁶ *Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) AntibodyTest Kit®* - Idexx Laboratories

³⁷ *Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (BOHV1) gB AntibodyTest Kit®* - Idexx Laboratories

³⁸ *IgA (Bovine) ELISA Kit®* - Bethyl Laboratories

Foi empregada uma coleção de antígenos composta por 20 sorotipos: *australis*; *bratislava*; *autumnalis*; *butembo*; *castellonis*; *batavie*; *canicola*; *whitcombi*; *cynopteri*; *grippotyphosa*; *hebdomadis*; *copenhageni*; *icterohaemorrhagiae*; *javanica*; *panama*; *pomona*; *pyrogenes*; *hardjo*; *shermani*; *tarassovi*; *sentot* e *guaricura*.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism 5.0 software® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Inicialmente, foi verificada a normalidade da distribuição dos dados, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a avaliação das diferenças entre os grupos aplicou-se o teste T não pareado para os dados com distribuição normal, e para dados que não apresentaram distribuição normal, analisou-se os dados pelo teste de Mann-Whitney.

Para a avaliação das diferenças entre os momentos dentro de cada grupo, aplicou-se o teste Repeated Measures ANOVA seguido pós teste de Newman-Keuls, para os dados com distribuição normal. Para os dados não paramétrico aplicou-se o Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn's (SAMPAIO, 1998).

5 RESULTADOS

Os resultados estão representados nos itens 5.1 a 5.4.3.

5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A partir da triagem de 20 animais, 16 foram considerados sadios e aptos a participarem da pesquisa atendendo todos os critérios de inclusão amostral propostos para o estudo.

5.2 EXAMES CLÍNICO GERAL E ESPECÍFICO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

No exame geral, os animais dos três grupos mantiveram seus parâmetros de frequências cardíaca e respiratória e temperatura corporal dentro dos limites estabelecidos para a espécie e idade (DIRKSEN; GRUNDER; STOBBER, 1993).

Nos animais do GA, foi constatada por meio da auscultação a presença de crepitação pulmonar em três bezerros (50%) a partir do M2. Nesses animais, também foi observada por palpação e inspeção direta a presença de reflexo de tosse positivo em dois bezerros (33%) a partir do M2. Nos animais do GB, foi detectada a partir do M2 por inspeção direta, palpação ou auscultação a presença de tosse espontânea em um animal (20%), respiração polipnéica em um bezerro (20%), crepitação pulmonar em um animal (20%) respiração rude em dois animais (40%) e reflexo de tosse positivo em três animais (60%) (Quadro 5).

Ao se avaliar os exames clínicos dos animais do grupo controle, foi verificado que dos cinco animais, apenas um (20%) apresentou sintomatologia clínica respiratória com presença de respiração polipnéica à inspeção e respiração rude e com crepitações à auscultação a partir dos 36 d.

Quadro 5 - Número e porcentagem de animais de apresentaram manifestações clínicas respiratórias durante o experimento - São Paulo - 2013

GA	GB	CTL
2 (33%)	Reflexo de tosse + 3 (60%)	-
3 (50%)	Crepitação pulmonar 1 (20%)	1 (20%)
-	Respiração polipnéica 1 (20%)	1 (20%)
-	Respiração ruidosa 2 (40%)	1 (20%)

Fonte: Gomes (2013)

CTL: grupo controle (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade).

No quadro 6, estão especificados os escores de secreção pulmonar definidos por endoscopia para os bezerros dos três grupos experimentais. Foi observado que quatro animais do GA apresentaram secreção pulmonar com escores que variaram de 1 a 3 a partir do M2. No grupo CTLA, quatro animais apresentaram escores que variaram de 1 a 3 no M3. No GB, foi verificado que os cinco animais apresentaram secreção pulmonar com escores que variaram de 1 a 3, no entanto dois apresentaram secreção no M1. No grupo CTLB, os cinco animais apresentaram secreção com escore que variou de 1 a 3 a partir do M2. A visualização da secreção pulmonar é possível pelo *QR code* da figura 20.

Quadro 6 - Escore de secreção pulmonar dos bezerros avaliados por endoscopia durante os momentos experimentais – São Paulo – 2013

Animal	M1	M2	M3	Animal	M1	M2	M3
1 GA	0	0	0	1 CTLA	0	0	0
2 GA	0	1	2	2 CTLA	0	0	3
3 GA	0	2	3	3 CTLA	0	0	2
4 GA	0	1	1	4 CTLA	0	0	1
5 GA	0	0	0	5 CTLA	0	0	1
6 GA	0	0	2				
1 GB	0	2	0	1 CTLB	0	2	0
2 GB	2	3	2	2 CTLB	0	3	0
3 GB	0	2	3	3 CTLB	0	0	3
4 GB	0	1	2	4 CTLB	0	1	2
5 GB	1	1	1	5 CTLB	0	1	0

Fonte: Gomes (2013)

CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2.

Figura 20 - *QR code* para visualização do vídeo representativo de endoscopias no primeiro e último momentos experimentais de um bezerro do grupo primovacinado aos 15 dias de vida - São Paulo – 2013.
(<https://www.youtube.com/watch?v=kJyWCBaEzTY>)

Fonte: Gomes (2013)
Para visualizar o vídeo deve-se utilizar um aplicativo de leitura de *QR code*, que pode ser baixado na loja de aplicativos do celular procurando por “*QR Scanner*” ou acessando o link diretamente do computador.

5.3 ANÁLISES DO SANGUE

Nas tabelas 1 a 7 e gráficos 1 a 18 estão representados os resultados de leucograma, imunofenotipagem de leucócitos sanguíneos, avaliação funcional de leucócitos sanguíneos e pesquisa de anticorpos antivirais séricos.

5.3.1 Leucograma

Os valores médios absolutos e erro padrão do leucograma de amostras sanguíneas dos bezerros estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios absolutos e erros padrão do leucograma de amostras de sangue de bezerros durante os quatro momentos experimentais - São Paulo - 2013

Leucócitos x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	7,76 ±0,88 ^{Ab}	11,28 ±1,23 ^{Aa}	10,04 ±0,64 ^{ABab}
GA	6,77 ±1,06 ^{Aa}	7,12 ±0,53 ^{Ba}	7,35 ±1,19 ^{Ba}
CTLB	9,06 ±1,27 ^{Aa}	10,04 ±0,64 ^{Aa}	8,34 ±0,65 ^{ABa}
GB	12,80 ±3,42 ^{Aa}	13,38 ±1,87 ^{Aa}	13,86 ±2,85 ^{Aa}
Neutrófilos x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	2,38 ±0,55 ^{Aa}	2,58 ±0,72 ^{ABa}	3,24 ±0,60 ^{Aa}
GA	2,02 ±0,51 ^{Aa}	2,15 ±0,44 ^{Ba}	3,10 ±1,22 ^{Aa}
CTLB	3,38 ±0,85 ^{Aa}	3,24 ±0,60 ^{ABa}	2,44 ±0,45 ^{Aa}
GB	5,62 ±2,67 ^{Aa}	5,60 ±1,22 ^{Aa}	7,36 ±2,48 ^{Aa}
Linfócitos x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	4,98 ±0,25 ^{Ab}	8,50 ±1,12 ^{Aa}	6,54 ±0,74 ^{Bab}
GA	4,70 ±0,57 ^{Aa}	4,97 ±0,56 ^{Ba}	4,22 ±0,38 ^{Aa}
CTLB	5,42 ±0,84 ^{Aa}	6,54 ±0,74 ^{ABa}	5,60 ±0,39 ^{ABa}
GB	7,04 ±1,30 ^{Aa}	7,46 ±1,44 ^{ABa}	5,86 ±0,66 ^{Ba}
Eosinófilos x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	0,02 ±0,02 ^{Aa}	0,04 ±0,04 ^{Aa}	0,04 ±0,02 ^{ABa}
GA	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Ba}
CTLB	0,02 ±0,02 ^{Aa}	0,04 ±0,02 ^{Aa}	0,16 ±0,07 ^{ABa}
GB	0,00 ±0,00 ^{Ab}	0,10 ±0,04 ^{Aab}	0,44 ±0,21 ^{Aa}
Monócitos x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	0,34 ±0,17 ^{Aa}	0,06 ±0,06 ^{Aa}	0,14 ±0,04 ^{Aa}
GA	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Aa}
CTLB	0,10 ±0,06 ^{Aa}	0,14 ±0,04 ^{Aa}	0,12 ±0,07 ^{Aa}
GB	0,06 ±0,02 ^{Aa}	0,14 ±0,06 ^{Aa}	0,12 ±0,12 ^{Aa}
Basófilos x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,04 ±0,04 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Aa}
GA	0,02 ±0,02 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}
CTLB	0,02 ±0,02 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}
GB	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,06 ±0,06 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Aa}
Bastonetes x 10 ³ /μL			
Grupo	M1	M2	M3
CTLA	0,08 ±0,02 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,06 ±0,04 ^{Aa}
GA	0,03 ±0,02 ^{Aa}	0,00 ±0,00 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Aa}
CTLB	0,14 ±0,07 ^{Aa}	0,06 ±0,04 ^{Aa}	0,02 ±0,02 ^{Aa}
GB	0,04 ±0,04 ^{Aa}	0,06 ±0,06 ^{Aa}	0,12 ±0,12 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Ao se analisar a média dos valores absolutos de leucócitos (Gráfico 1), nota-se que no GA a média permanece sem se alterar ao longo dos momentos, diferente do controle CTLA

no qual aumenta no M2 ($P = 0,02$) e se mantém no M3. No M2, a média do GA é menor que a do CTLA ($P = 0,009$) e do GB ($P = 0,007$). No M3, houve discreta tendência da média do GA ser menor que a do CTLA ($P = 0,09$).

Gráfico 1 - Valores médios absolutos e erros padrão de leucócitos nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (box plot branco) e GA (box plot cinza) acima e dos grupos CTLB (box plot branco) e GB (box plot cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a, b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

Na análise no número absoluto de neutrófilos (Gráfico 2), foi verificado no M2 que essas células se encontravam em maior número no sangue dos animais do GB do que do GA ($P = 0,02$). E no M3 houve tendência do número de neutrófilos ser maior no GB do que no CTLB ($P = 0,09$).

Gráfico 2 - Valores médios absolutos e erros padrão de neutrófilos nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (box plot branco) e GA (box plot cinza) acima e dos grupos CTLB (box plot branco) e GB (box plot cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^a indicam $P \geq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

Quando foram avaliados os valores médios absolutos de linfócitos (Gráfico 3), notou-se que no GA os valores permaneceram sem se alterar ao longo dos momentos, diferente do controle (CTLA) no qual este número aumenta no M2 ($P = 0,03$) e se mantém no M3. No M2 ($P = 0,01$) e no M3 ($P = 0,02$) os valores do GA são menores do que os do CTLA e no M3 menores do que os do GB ($P = 0,05$).

Gráfico 3 - Valores médios absolutos e erros padrão de linfócitos nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (box plot branco) e GA (box plot cinza) acima e dos grupos CTLB (box plot branco) e GB (box plot cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a, b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Ao se analisar os valores absolutos de eosinófilos, foi verificado o aumento da média do GB do M1 ao M3 ($P = 0,01$), sendo a média do GB maior que a do GA no M3 ($P = 0,009$).

Nas outras populações de leucócitos (monócitos, basófilos e bastonetes) não houve diferença estatística entre as médias dos grupos.

5.3.2 Imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos

Na tabela 2 estão representados os valores médios percentuais referentes à quantificação das populações leucocitárias por citometria de fluxo nas amostras de sangue dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 2 - Médias e erros padrão das porcentagens populacionais de granulócitos e de mononucleares identificadas por citometria de fluxo no sangue de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013

Granulócitos			
CH138 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	28,02 ± 3,58 ^{Aa}	19,36 ± 3,84 ^{Ba}	36,20 ± 4,69 ^{Aa}
GA	25,88 ± 4,42 ^{Aa}	33,40 ± 3,79 ^{Aa}	28,33 ± 6,01 ^{Aa}
CTLB	30,58 ± 5,09 ^{Aa}	36,20 ± 4,69 ^{Aa}	38,62 ± 4,49 ^{Aa}
GB	36,50 ± 8,26 ^{Aa}	42,80 ± 5,51 ^{ABa}	47,06 ± 6,96 ^{Aa}
Mononucleares			
CD14 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	12,48 ± 2,34 ^{ABa}	21,79 ± 6,12 ^{Aa}	19,46 ± 2,65 ^{Aa}
GA	10,73 ± 1,62 ^{Bc}	18,43 ± 1,29 ^{Ab}	25,90 ± 3,25 ^{Aa}
CTLB	20,58 ± 3,61 ^{ABa}	19,46 ± 2,65 ^{Aa}	17,29 ± 4,61 ^{Aa}
GB	21,31 ± 3,73 ^{Aa}	18,14 ± 1,82 ^{Aa}	19,16 ± 3,03 ^{Aa}
CD3 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	30,54 ± 4,61 ^{Aa}	27,48 ± 2,98 ^{Ba}	26,56 ± 2,47 ^{Aa}
GA	32,82 ± 4,11 ^{Aa}	37,48 ± 2,06 ^{Aa}	43,32 ± 9,12 ^{Aa}
CTLB	30,90 ± 5,71 ^{Aa}	26,56 ± 2,47 ^{ABa}	37,18 ± 8,99 ^{Aa}
GB	26,73 ± 6,55 ^{Aa}	19,88 ± 4,16 ^{Ba}	19,09 ± 5,37 ^{Aa}
CD4 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	4,33 ± 1,90 ^{Aa}	7,80 ± 2,04 ^{Aa}	6,85 ± 1,65 ^{Aa}
GA	7,27 ± 1,47 ^{Aa}	10,85 ± 2,47 ^{Aa}	8,69 ± 3,02 ^{Aa}
CTLB	8,42 ± 1,86 ^{Aa}	6,85 ± 1,65 ^{Aa}	5,18 ± 1,04 ^{Aa}
GB	4,71 ± 2,36 ^{Aa}	5,56 ± 2,20 ^{Aa}	3,85 ± 1,06 ^{Aa}
CD8 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	5,54 ± 1,01 ^{Aa}	3,94 ± 1,18 ^{Aa}	6,50 ± 0,46 ^{Aa}
GA	9,52 ± 2,37 ^{Aa}	6,65 ± 0,99 ^{Aa}	6,62 ± 2,56 ^{Aa}
CTLB	6,65 ± 0,54 ^{Aa}	6,50 ± 0,46 ^{Aa}	5,43 ± 0,62 ^{Aa}
GB	5,77 ± 1,40 ^{Aa}	4,22 ± 1,29 ^{Aa}	3,17 ± 1,18 ^{Aa}
CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	0,26 ± 0,17 ^{Aa}	0,21 ± 0,14 ^{Ba}	0,32 ± 0,10 ^{Ba}
GA	0,54 ± 0,19 ^{Aa}	0,97 ± 0,47 ^{Aa}	1,08 ± 0,27 ^{Aa}
CTLB	0,22 ± 0,06 ^{Aa}	0,32 ± 0,10 ^{ABa}	0,28 ± 0,10 ^{ABa}
GB	0,78 ± 0,36 ^{Aa}	0,28 ± 0,11 ^{ABa}	0,30 ± 0,10 ^{Ba}
CD4 ⁺ CD8 ⁻ (%)	M1	M2	M3
CTLA	20,40 ± 4,71 ^{Aa}	15,53 ± 3,00 ^{ABa}	12,88 ± 2,85 ^{Ba}
GA	15,50 ± 2,44 ^{Ab}	19,01 ± 2,43 ^{Aab}	26,94 ± 5,10 ^{Aa}
CTLB	15,60 ± 5,11 ^{Aa}	12,88 ± 2,85 ^{ABa}	26,31 ± 8,76 ^{ABa}
GB	15,47 ± 5,80 ^{Aa}	9,822 ± 3,45 ^{Ba}	11,77 ± 3,73 ^{Ba}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b,c} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Com base nos resultados da tabela 2, foi observado que no M2 (Gráfico 4), o GA apresentou maior porcentagem de granulócitos CH138⁺ do que o grupo CTLA ($P = 0,03$) e este grupo apresentou média menor do que o CTLB ($P = 0,02$) no M2.

Gráfico 4 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de granulócitos CH138⁺ nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) no momento 2 (M2) - São Paulo - 2013.

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Em relação às populações de mononucleares CD14⁺ (Gráfico 5), foi constatado que o GA apresentou aumento no valor médio ao longo dos momentos ($P = 0,02$). No M1, a média do GA foi menor que a do grupo GB ($P = 0,02$).

Gráfico 5 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de células mononucleares CD14⁺ nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013.

Fonte: Gomes (2013)

a,b,c indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

Ao se analisar a população de mononucleares $CD3^+$ (Gráfico 6), foi demonstrado que no M2 a porcentagem de células foi maior no GA do que nos grupos CTLA ($P = 0,02$) e GB ($P = 0,003$).

Gráfico 6 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de células mononucleares $CD3^+$ nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) no momento dois (M2) - São Paulo - 2013.

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

A média das porcentagens de células $CD8^+$ não apresentou diferença estatística.

A média das porcentagens de células $TCD4^+CD8^+$ (Gráfico 7) foi maior no GA do que no CTLA nos momentos M2 ($P = 0,02$) e M3 ($P = 0,02$). No M3, o GA também apresentou valores maiores do que o grupo GB ($P = 0,04$).

Gráfico 7 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de células TCD4⁺CD8⁺ nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e dos grupos CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

Letras iguais indicam $P \geq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

O GA apresentou aumento progressivo dos valores percentuais de células TCD4⁺CD8⁺ ($P = 0,03$), diferindo do grupo CTLA no M3 ($P = 0,05$) e do GB no M2 ($P = 0,05$) e no M3 ($P = 0,05$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de células TCD4⁺CD8⁺ nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e dos grupos CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

Letras diferentes^{a, b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

Letras diferentes^{a, b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

5.3.3 Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos

Na tabela 3 estão representados os valores médios percentuais e de média geométrica de intensidade de fluorescência referentes à quantificação das populações leucocitárias que produziram ERO intracelular nas amostras de sangue dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 3 - Médias das porcentagens, médias geométricas da intensidade de fluorescência em valores arbitrários e erros padrão da produção de espécies reativas de oxigênio basal por granulócitos CH138⁺ e mononucleares CD14⁺ no sangue de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Granulócitos CH138⁺			
Produção de ERO (%)	M1	M2	M3
CTLA	99,74 ± 0,07 ^{Aa}	99,30 ± 0,55 ^{Aa}	99,96 ± 0,02 ^{Aa}
GA	99,85 ± 0,09 ^{Aa}	99,95 ± 0,02 ^{Aa}	99,67 ± 0,22 ^{Aa}
CTLB	99,42 ± 0,30 ^{Aa}	99,96 ± 0,02 ^{Aa}	99,98 ± 0,02 ^{Aa}
GB	99,78 ± 0,13 ^{Aa}	99,92 ± 0,08 ^{Aa}	99,90 ± 0,05 ^{Aa}
Produção de ERO (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	682,3 ± 195,5 ^{ABa}	1036,0 ± 236,8 ^{Aa}	609,4 ± 127,9 ^{ABa}
GA	1115,0 ± 188,4 ^{Aa}	702,0 ± 115,2 ^{Aa}	1033,0 ± 185,2 ^{Aa}
CTLB	1151,0 ± 225,7 ^{Aa}	609,4 ± 127,9 ^{Aa}	774,2 ± 145,5 ^{ABa}
GB	450,0 ± 140,7 ^{Ba}	763,2 ± 159,7 ^{Aa}	375,8 ± 112,4 ^{Ba}
Mononucleares CD14⁺			
Produção de ERO (%)	M1	M2	M3
CTLA	28,19 ± 10,93 ^{Ba}	59,92 ± 14,52 ^{ABa}	46,58 ± 7,17 ^{Aa}
GA	42,85 ± 5,94 ^{ABa}	44,43 ± 6,06 ^{Ba}	63,03 ± 5,14 ^{Aa}
CTLB	58,86 ± 5,78 ^{Aa}	46,58 ± 7,17 ^{Ba}	55,38 ± 8,69 ^{Aa}
GB	56,34 ± 7,62 ^{ABa}	79,30 ± 2,91 ^{Aa}	68,84 ± 1,95 ^{Aa}
Produção de ERO (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	74,34 ± 25,61 ^{ABa}	109,6 ± 46,98 ^{Aa}	43,04 ± 12,74 ^{Ba}
GA	93,70 ± 16,68 ^{Aa}	118,8 ± 49,74 ^{Aa}	44,42 ± 9,64 ^{Ba}
CTLB	206,8 ± 87,55 ^{ABa}	43,04 ± 12,74 ^{Aa}	205,6 ± 54,23 ^{Aa}
GB	30,08 ± 4,35 ^{Ba}	104,8 ± 36,03 ^{Aa}	89,94 ± 15,04 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) e letras minúsculas iguais sobrescritas^a dentro de uma mesma linha entre os valores indicam valores iguais ($P \geq 0,05$). Os resultados são apresentados como a média ± SEM. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. MGIF: média geométrica de intensidade de fluorescência de diclorofluoresceína. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Com base nos resultados da tabela 3, não foi verificada diferença na porcentagem de produção de ERO por granulócitos CH138⁺ entre os grupos, porém a média geométrica de intensidade de fluorescência (MGIF) dessa mesma população foi menor no M1 do GB em relação ao CTLB ($P = 0,02$) e em relação ao GA ($P = 0,007$). No M3, a MGIF do GB foi menor do que a do GA ($P = 0,02$), havendo também no M3 a tendência da MGIF do GB ser menor do que a do CTLB ($P = 0,06$) (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Gráfico de caixa da média geométrica de intensidade de fluorescência e erros padrão de granulócitos CH138⁺ que produziram ERO nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos um (M1; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013.

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

Na população de mononucleares CD14⁺, foi constatado que a porcentagem de produção de ERO não diferiu entre os grupos GA e GB no M1, porém diferiu entre os controles ($P = 0,04$) sendo a média do CTLB maior do que a do CTLA. No M2, o GB apresentou maior porcentagem de produção de ERO do que o CTLB ($P = 0,003$) e do que o GA ($P = 0,0009$). Já em relação à MGIF, foi verificado que a produção de ERO pelos mononucleares CD14⁺ do GB foi menor em relação ao GA no M1 ($P = 0,008$) e maior no M3 ($P = 0,03$). Também no M3, a MGIF do GB apresentou tendência a ser menor do que a do CTLB ($P = 0,07$) e o CTLA apresentou valores menores do que o CTLB ($P = 0,02$) não diferindo do GA (Gráficos 10 e 11).

Gráfico 10 - Valores médios percentuais e erros padrão de células mononucleares CD14⁺ que produziram ERO nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos um (M1; esquerda) e dois (M2; direita) - São Paulo - 2013.

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Gráfico 11 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de células mononucleares CD14⁺ que produziram ERO nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos um (M1; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo – 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

Na tabela 4 estão representados os valores médios percentuais e de média geométrica de intensidade de fluorescência referentes à quantificação das populações leucocitárias que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de sangue dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 4 - Médias das porcentagens, médias geométricas da intensidade de fluorescência em valores arbitrários e erros padrão de granulócitos CH138⁺ e mononucleares CD14⁺ que fagocitaram *Staphylococcus aureus* no sangue de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013

Granulócitos CH138 ⁺			
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	98,26 ± 0,48 ^{Aa}	95,58 ± 1,89 ^{ABa}	91,18 ± 4,19 ^{Aa}
GA	97,25 ± 0,89 ^{Aa}	96,90 ± 0,86 ^{Aa}	82,28 ± 3,20 ^{Ab}
CTLB	88,70 ± 4,76 ^{Aa}	91,18 ± 4,19 ^{ABa}	79,66 ± 7,94 ^{Aa}
GB	90,40 ± 3,42 ^{Aa}	85,58 ± 3,54 ^{Ba}	83,18 ± 1,45 ^{Aa}
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	499,6 ± 101,1 ^{Aa}	386,0 ± 100,8 ^{Aa}	423,8 ± 115,0 ^{Aa}
GA	479,3 ± 217,7 ^{Aa}	225,8 ± 66,36 ^{Aa}	160,1 ± 27,56 ^{Ba}
CTLB	358,8 ± 179,8 ^{Aa}	423,8 ± 115,0 ^{Aa}	330,0 ± 53,95 ^{ABa}
GB	263,8 ± 80,54 ^{Aa}	215,7 ± 62,22 ^{Aa}	161,8 ± 25,32 ^{Ba}
Mononucleares CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	88,06 ± 5,22 ^{Aa}	86,06 ± 1,22 ^{Aa}	90,82 ± 3,49 ^{Aa}
GA	86,20 ± 2,19 ^{Aa}	90,70 ± 2,70 ^{Aa}	86,77 ± 4,10 ^{Aa}
CTLB	86,26 ± 4,35 ^{Aa}	90,82 ± 3,49 ^{Aa}	81,48 ± 6,62 ^{Aa}
GB	88,36 ± 3,19 ^{Aa}	91,08 ± 1,74 ^{Aa}	90,84 ± 2,34 ^{Aa}
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	445,0 ± 164,4 ^{Aa}	220,5 ± 43,92 ^{Aa}	211,8 ± 46,70 ^{Aa}
GA	157,0 ± 49,86 ^{Aa}	136,8 ± 32,44 ^{Aa}	132,1 ± 21,46 ^{Aa}
CTLB	218,1 ± 116,0 ^{Aa}	211,8 ± 46,70 ^{Aa}	257,0 ± 25,35 ^{Aa}
GB	169,0 ± 22,83 ^{Aa}	108,6 ± 13,94 ^{Aa}	169,6 ± 36,74 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. MGFI: média geométrica de intensidade de fluorescência. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Ao se analisar os valores médios percentuais da população de granulócitos CH138⁺ que fagocitaram *S. aureus* (Gráficos 12 e 13), foi verificado que o GA apresentou média menor no M3 do que nos outros momentos ($P = 0,0002$) e que a média deste grupo foi maior do que do GB no M2 ($P = 0,008$). Na análise da MGIF, a média dos valores de GA foi menor do que o CTLA no M3 ($P = 0,0008$) assim como a de GB foi menor do que o CTLB no M3 ($P = 0,02$).

Gráfico 12 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de granulócitos CH138⁺ que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e dos grupos CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Gráfico 13 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de granulócitos CH138⁺ que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) no momento três (M3) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Em relação à população de mononucleares CD14⁺ (Gráfico 14) não houve diferença entre os grupos e seus controles, no entanto ao se avaliar a MGIF foi possível notar que houve tendência de os valores do GB serem menores do que o CTLB tanto no M2 ($P = 0,07$) quanto no M3 ($P = 0,09$).

Gráfico 14 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de células mononucleares CD14⁺ que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos dois (M2; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

Na tabela 5 estão representados os valores médios percentuais e de média geométrica de intensidade de fluorescência referentes à quantificação das populações leucocitárias que fagocitaram *E. coli* nas amostras de sangue dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 5 - Médias das porcentagens, médias geométricas da intensidade de fluorescência em valores arbitrários e erros padrão de granulócitos CH138⁺ e mononucleares CD14⁺ que fagocitaram *Escherichia coli* no sangue de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013 (continua)

Granulócitos CH138⁺			
Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	52,58 ± 12,55 ^{ABa}	15,78 ± 3,44 ^{Aa}	32,23 ± 10,82 ^{Aa}
GA	28,62 ± 28,62 ^{ABa}	24,24 ± 11,40 ^{Aa}	15,86 ± 4,65 ^{Aa}
CTLB	26,02 ± 3,99 ^{Aa}	32,23 ± 10,82 ^{Aa}	25,00 ± 4,14 ^{Aa}
GB	10,31 ± 3,59 ^{Ba}	25,86 ± 7,77 ^{Aa}	18,58 ± 8,04 ^{Aa}
Fagocitose de <i>E. coli</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	34,56 ± 6,22 ^{Aa}	15,10 ± 3,13 ^{Ba}	37,14 ± 7,66 ^{ABa}
GA	21,87 ± 4,32 ^{Aa}	24,33 ± 6,07 ^{ABa}	32,23 ± 1,33 ^{Ba}
CTLB	23,49 ± 5,52 ^{Aa}	37,14 ± 7,66 ^{Aa}	37,76 ± 5,51 ^{ABa}
GB	33,34 ± 5,22 ^{Aa}	21,28 ± 3,29 ^{ABa}	26,50 ± 1,50 ^{Aa}
Mononucleares CD14⁺			
Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	42,85 ± 22,87 ^{ABa}	19,56 ± 9,53 ^{Aa}	41,14 ± 12,60 ^{Aa}
GA	12,29 ± 3,47 ^{Ba}	42,55 ± 9,83 ^{Ab}	38,96 ± 8,36 ^{Ab}
CTLB	37,30 ± 14,30 ^{ABa}	41,14 ± 12,60 ^{Aa}	41,59 ± 12,04 ^{Aa}
GB	38,40 ± 8,48 ^{Aa}	60,34 ± 6,26 ^{Aa}	47,58 ± 17,68 ^{Aa}
Fagocitose de <i>E. coli</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	335,3 ± 180,8 ^{Aa}	44,62 ± 16,24 ^{ABa}	85,04 ± 23,53 ^{Aa}
GA	132,3 ± 106,8 ^{Aa}	27,60 ± 5,45 ^{ABa}	31,78 ± 3,92 ^{Ba}
CTLB	72,10 ± 16,87 ^{Aa}	85,04 ± 23,53 ^{Aa}	95,52 ± 14,72 ^{Aa}
GB	37,16 ± 6,56 ^{Aa}	34,30 ± 7,74 ^{Ba}	38,38 ± 7,57 ^{Ba}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B,C} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. MGFI: média geométrica de intensidade de fluorescência. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Ao se analisar os resultados de porcentagem de mononucleares CD14⁺ que fagocitaram *E. coli* (Gráfico 15), foi verificado que a média dos animais do GA aumentou no M2 ($P = 0,03$), porém não diferiu do CTLA. Por outro lado, ao se analisar a MGIF, foi constatado que a média do GB foi menor do que a do CTLB no M2 ($P = 0,008$) e no M3 ($P = 0,009$) e no M3 a média de GA foi menor que a do CTLA ($P = 0,004$).

Gráfico 15 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de mononucleares CD14⁺ que fagocitaram *E. coli* nas amostras de sangue de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos dois (M2; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

5.3.4 Pesquisa de anticorpos

Nas tabelas 8 e 9, e nos gráficos 16 a 18 estão representados os valores médios e erros padrão das unidades de anticorpos séricos neutralizantes e específicos contra os vírus VSRB, VDVB-1, HVB-1 e PI-3 e contra os sorotipos de *Leptospira*.

5.3.4.1 Anticorpos antivirais neutralizantes

Na tabela 6 estão representados os valores médios em escala logarítmica de anticorpos neutralizantes contra o VSRB, VDVB-1, HVB-1 e PI-3 de 60 amostras de soro sanguíneo dos bezerros durante os três momentos experimentais realizados por virusneutralização.

Tabela 6 - Médias e erro padrão dos valores em log do teste de virusneutralização na detecção de anticorpos que reagiram com o vírus sincicial respiratório bovino (VSRB), vírus da diarreia bovina tipo 1 (VDVB-1), herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1) e vírus da parainfluenza tipo 3 (PI-3) em amostras de soro sanguíneo dos bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013 (continua)

Anticorpos neutralizantes			
VSRB	M1	M2	M3
CTLA	0,4 ±0,3 ^{Ba}	0,2 ±0,1 ^{Ba}	0,4 ±0,2 ^{Ba}
GA	1,6 ±0,4 ^{Aa}	1,5 ±0,3 ^{Aa}	1,2 ±0,2 ^{Aa}
CTLB	0,4 ±0,2 ^{ABa}	0,4 ±0,2 ^{Ba}	0,5 ±0,2 ^{ABa}
GB	0,4 ±0,3 ^{Ba}	0,8 ±0,2 ^{ABa}	0,8 ±0,3 ^{ABa}
VDVB-1	M1	M2	M3
CTLA	0,4 ±0,4 ^{Ba}	0,4 ±0,4 ^{ABa}	0,3 ±0,3 ^{ABa}
GA	1,9 ±0,3 ^{Aa}	1,3 ±0,3 ^{Ab}	1,3 ±0,3 ^{Ab}
CTLB	0,3 ±0,3 ^{ABa}	0,3 ±0,3 ^{ABa}	0,3 ±0,3 ^{ABa}
GB	0,0 ±0,0 ^{Ba}	0,0 ±0,0 ^{Ba}	0,0 ±0,0 ^{Ba}
HVB-1	M1	M2	M3
CTLA	0,6 ±0,4 ^{Aa}	0,9 ±0,4 ^{Aa}	0,5 ±0,2 ^{Aa}
GA	1,9 ±0,1 ^{Ba}	1,4 ±0,3 ^{Aab}	1,1 ±0,2 ^{Ab}
CTLB	0,7 ±0,3 ^{ABa}	0,5 ±0,2 ^{ABa}	0,2 ±0,1 ^{Ab}
GB	0,5 ±0,4 ^{Aa}	0,4 ±0,3 ^{Aa}	0,9 ±0,4 ^{Aa}
PI-3	M1	M2	M3
CTLA	1,1 ±0,4 ^{Aa}	1,6 ±0,4 ^{Aa}	1,2 ±0,2 ^{Aa}
GA	1,9 ±0,4 ^{Aa}	1,1 ±0,4 ^{Aa}	1,0 ±0,3 ^{Aa}
CTLB	1,1 ±0,4 ^{Aa}	1,2 ±0,2 ^{Aa}	1,3 ±0,2 ^{Aa}
GB	1,0 ±0,3 ^{Aa}	1,0 ±0,3 ^{Aa}	1,0 ±0,1 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± SEM. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Com base nos resultados da tabela 6, foi constatado que a média logarítmica da quantidade de anticorpos neutralizantes para o VSRB foi maior nos animais do GA do que do CTLA desde o M1 ($P = 0,05$) até o M3 ($P = 0,02$). A média de GA também foi maior que a do GB no momento M1 ($P = 0,05$). O GB não apresentou diferença em relação ao CTLB em nenhum momento (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Valores médios em log e erros padrão da titulação de anticorpos neutralizantes contra o VSRB nas amostras de soro sanguíneo dos bezerros dos grupos CTLA (bola preta) e GA (bola branca) acima e dos grupos CTLB (bola preta) e GB (bola branca) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^a indicam $P \geq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Na análise dos resultados quanto à presença de anticorpos neutralizantes para o VDVB-1 (Gráfico 17), foi constatado que o GA apresentou a média logarítmica maior no M1 em relação aos outros momentos M2 e M3 ($P = 0,0002$) e que os valores do GA foram maiores do que os do CTLA ($P = 0,03$) e do que do GB ($P = 0,003$) no M1. No M2 a média de GA foi maior que a do GB ($P = 0,02$). No M3, a média de GA foi maior que a média de GB ($P = 0,02$). Houve também no M3 tendência da média de GA ser maior que a de CTLA no M3 ($P = 0,08$).

Gráfico 17 - Valores médios em log e erros padrão da titulação de anticorpos neutralizantes contra VDVB-1 nas amostras de soro sanguíneo dos bezerros do grupo GA (acima) e dos momentos 1 (M1; esquerda), dois (M2; centro) e três (M3; direita) dos grupos CTLA, CTLB (bola preta), GA e GB (bola branca) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

Na análise dos resultados quanto à presença de anticorpos neutralizantes para o HVB-1 (Gráfico 18), foi verificado que a média logarítmica de GA foi maior no M1 do que no M3 ($P = 0,01$). No M1, o GA apresentou média maior do que o CTLA ($P = 0,02$) e do que o GB ($P = 0,02$).

Gráfico 18 - Valores médios em log e erros padrão da titulação de anticorpos neutralizantes contra HVB-1 nas amostras de soro sanguíneo dos bezerros do grupo GA (acima) e dos momentos 1 (M1; esquerda), dois (M2; centro) e três (M3; direita) dos grupos CTLA, CTLB (bola preta), GA e GB (bola branca) (abaixo) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Não foi evidenciada diferença entre os grupos quanto à presença de anticorpos neutralizantes para o PI-3.

5.3.4.2 Anticorpos antivirais específicos

Na tabela 7 estão representados os escores de anticorpos específicos contra o vírus sincicial respiratório bovino (VSRB-IgG; VSRB-IgM), VDVB-1 e HVB-1 de 60 amostras de soro sanguíneo dos bezerros durante os três momentos experimentais realizados por ELISA.

Tabela 7 - Médias e erro padrão do escore de anticorpos específicos contra o vírus sincicial respiratório bovino (VSRB-IgG; VSRB-IgM), vírus da diarreia bovina tipo 1 (VDVB-1) e herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1) no soro sanguíneo dos bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013

(continua)

Anticorpos virais específicos			
VSRB-IgG	M1	M2	M3
CTLA	0,8 ± 0,6 ^{Ba}	0,8 ± 0,4 ^{ABa}	0,2 ± 0,2 ^{Ba}
GA	4,0 ± 0,5 ^{Aa}	2,8 ± 0,7 ^{Aab}	1,5 ± 0,5 ^{Ab}
CTLB	0,4 ± 0,2 ^{ABa}	0,2 ± 0,2 ^{ABa}	0,0 ± 0,0 ^{ABa}
GB	0,4 ± 0,2 ^{Ba}	0,4 ± 0,2 ^{Ba}	0,6 ± 0,4 ^{ABa}
VSRB-IgM	M1	M2	M3
CTLA	0,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,2 ± 0,2 ^{Aa}
GA	0,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,2 ± 0,2 ^{Aa}
CTLB	0,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,2 ± 0,2 ^{Aa}	0,2 ± 0,2 ^{Aa}
GB	0,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,4 ± 0,2 ^{Aa}	0,0 ± 0,0 ^{Aa}
VDVB-1	M1	M2	M3
CTLA	0,4 ± 0,2 ^{Aa}	0,6 ± 0,2 ^{Aa}	0,6 ± 0,2 ^{Aa}
GA	1,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,8 ± 0,2 ^{Aa}	0,8 ± 1,2 ^{Aa}
CTLB	0,6 ± 0,2 ^{Aa}	0,6 ± 0,2 ^{Aa}	0,4 ± 0,2 ^{Aa}
GB	0,4 ± 0,2 ^{Aa}	0,6 ± 0,2 ^{Aa}	0,4 ± 0,2 ^{Aa}
HVB-1	M1	M2	M3
CTLA	0,8 ± 0,2 ^{Aa}	0,8 ± 0,2 ^{Aa}	0,8 ± 0,2 ^{Aa}
GA	1,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,8 ± 0,2 ^{Aa}	1,0 ± 0,0 ^{Aa}
CTLB	1,0 ± 0,0 ^{Aa}	0,8 ± 0,2 ^{Aa}	0,8 ± 0,2 ^{Aa}
GB	0,8 ± 0,2 ^{Aa}	0,6 ± 0,2 ^{Aa}	1,0 ± 0,0 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Com base nos resultados da tabela 7, foi possível observar que houve variação somente no escore de anticorpos IgG contra VSRB. A média dos animais do GA foi maior no M1 do que no M3 ($P = 0,04$). No M1, a média do GA foi maior que a dos grupos CTLA ($P = 0,02$) e GB ($P = 0,007$). No M2, a média do GA foi maior do que a dos grupos GB ($P = 0,04$). Por fim, no M3, a média de GA foi maior que a do grupo CTLA ($P = 0,05$).

5.3.4.4 Anticorpos bacterianos

A maioria dos resultados da soroaglutinação microscópica foi negativa para os sorotipos de *Leptospira spp* utilizados. De um total de 60 amostras analisadas, somente três foram positivas para o sorotipo *pomona*. Uma delas pertencente a um animal do GA no M1

(aos 15 dias de idade) e outras duas amostras a um dos animais do grupo controle, sendo a primeira reação aos 36 dias de vida e a outra aos 57.

5.4 ANÁLISES DO LBA

Nas tabelas 8 a 13 e gráficos 19 a 34 estão representados os resultados de citologia do LBA, imunofenotipagem de leucócitos pulmonares, avaliação de fagócitos pulmonares e pesquisa de IgA local.

5.4.1 Citologia

Os dados da análise citológica broncoalveolar dos três grupos nos três momentos experimentais estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8 - Médias e erro padrão das porcentagens dos componentes do lavado broncoalveolar de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013 (continua)

Citologia do lavado broncoalveolar			
Macrófagos	M1	M2	M3
CTLA	84,93 ± 6,05 ^{Aa}	73,73 ± 11,64 ^{Aa}	63,80 ± 11,20 ^{Aa}
GA	79,83 ± 10,04 ^{Aa}	70,28 ± 10,25 ^{Aab}	38,83 ± 9,84 ^{Ab}
CTLB	72,25 ± 9,51 ^{Aa}	63,80 ± 11,20 ^{Aa}	60,87 ± 10,07 ^{Aa}
GB	56,87 ± 11,92 ^{Aa}	50,47 ± 11,60 ^{Aa}	52,20 ± 6,70 ^{Aa}
Neutrófilos	M1	M2	M3
CTLA	13,07 ± 5,72 ^{Aa}	23,87 ± 11,99 ^{Aa}	27,00 ± 10,96 ^{Aa}
GA	21,53 ± 11,87 ^{Aa}	40,93 ± 10,33 ^{Aab}	68,00 ± 8,17 ^{Ab}
CTLB	23,50 ± 10,07 ^{Aa}	27,00 ± 10,96 ^{Aa}	34,53 ± 9,68 ^{Aa}
GB	40,73 ± 12,52 ^{Aa}	48,73 ± 12,14 ^{Aa}	35,60 ± 4,66 ^{Aa}
Células gigantes	M1	M2	M3
CTLA	1,53 ± 0,36 ^{Aa}	1,67 ± 0,71 ^{Aa}	1,40 ± 0,75 ^{ABa}
GA	2,33 ± 0,74 ^{Aa}	1,55 ± 0,49 ^{Aa}	1,00 ± 0,61 ^{Ba}
CTLB	3,16 ± 1,13 ^{Aa}	1,40 ± 0,75 ^{Aa}	3,13 ± 0,69 ^{ABa}
GB	2,40 ± 1,46 ^{Aa}	0,87 ± 0,34 ^{Aa}	2,87 ± 0,48 ^{Aa}
Eosinófilos	M1	M2	M3
CTLA	0,07 ± 0,07 ^{Aa}	0,07 ± 0,07 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}
GA	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}
CTLB	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}
GB	0,07 ± 0,07 ^{Aa}	0,27 ± 0,27 ^{Aa}	2,73 ± 2,18 ^{Aa}

	(conclusão)		
Células ciliadas	M1	M2	M3
CTLA	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,07 ± 0,07 ^{Aa}
GA	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}
CTLB	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,07 ± 0,07 ^{Aa}	0,20 ± 0,20 ^{Aa}
GB	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas ^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas ^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Com base nos resultados da tabela 8, foi constatado que a porcentagem média de macrófagos diminuiu ($P = 0,05$) e a de neutrófilos aumentou ($P = 0,03$) no GA do M1 ao M3 (Gráficos 19 e 20).

Gráfico 19 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de macrófagos nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

Gráfico 20 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de neutrófilos nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

Em relação à população de células gigantes, houve somente diferença entre o GA e o grupo GB ($P = 0,05$) no M3. Não foram observadas diferenças nas populações de eosinófilos e de células ciliadas.

5.4.2 Imunofenotipagem dos leucócitos pulmonares

Na tabela 9 estão representados os valores médios percentuais referentes à quantificação das populações leucocitárias nas amostras de LBA dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 9 - Médias e erros padrão das porcentagens populacionais de macrófagos pulmonares vacuolizados, macrófagos pulmonares monócitos-like e neutrófilos identificadas por citometria de fluxo no lavado broncoalveolar de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013 (continua)

Macrófagos pulmonares vacuolizados			
CD14 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	80,06 ± 2,28 ^{Aa}	66,50 ± 10,29 ^{Aa}	74,92 ± 5,74 ^{ABa}
GA	70,98 ± 10,32 ^{Aa}	69,72 ± 4,20 ^{Aa}	55,10 ± 7,22 ^{Ba}
CTLB	69,25 ± 5,34 ^{Aa}	74,92 ± 5,74 ^{Aa}	71,60 ± 3,12 ^{ABa}
GB	70,60 ± 7,72 ^{Aa}	71,78 ± 11,52 ^{Aa}	78,40 ± 3,24 ^{Aa}
CD4 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	15,97 ± 6,00 ^{Aa}	29,05 ± 8,18 ^{Aa}	40,62 ± 12,52 ^{Aa}
GA	10,15 ± 2,62 ^{Aa}	14,72 ± 4,87 ^{Ba}	21,50 ± 4,39 ^{Aa}
CTLB	37,96 ± 12,95 ^{Aa}	40,62 ± 12,52 ^{ABa}	56,84 ± 5,39 ^{Aa}
GB	24,48 ± 11,74 ^{Aa}	34,18 ± 11,65 ^{Aa}	42,76 ± 13,00 ^{Aa}
CD8 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	11,96 ± 5,89 ^{Aa}	10,35 ± 2,51 ^{Aa}	6,88 ± 3,46 ^{Aa}
GA	6,46 ± 4,45 ^{Aa}	6,01 ± 1,70 ^{Aa}	4,36 ± 1,20 ^{Aa}
CTLB	4,19 ± 1,46 ^{Aa}	6,88 ± 3,46 ^{Aa}	1,71 ± 0,19 ^{Aa}
GB	4,42 ± 2,26 ^{Aa}	4,11 ± 1,19 ^{Aa}	3,43 ± 1,86 ^{Aa}
CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	25,55 ± 12,90 ^{Aa}	32,54 ± 7,11 ^{Aa}	17,94 ± 3,82 ^{ABa}
GA	7,35 ± 5,40 ^{Aa}	31,40 ± 12,40 ^{Aa}	19,79 ± 4,59 ^{Aa}
CTLB	33,65 ± 13,63 ^{Aa}	17,94 ± 3,82 ^{Aa}	15,63 ± 6,76 ^{Aa}
GB	11,64 ± 4,66 ^{Aa}	13,77 ± 2,94 ^{Aa}	1,96 ± 0,23 ^{Ba}
CD4 ⁺ CD8 ⁻ (%)	M1	M2	M3
CTLA	46,53 ± 16,20 ^{Aa}	28,08 ± 6,38 ^{Aa}	34,57 ± 11,96 ^{Aa}
GA	76,03 ± 11,22 ^{Aa}	47,85 ± 13,80 ^{Aa}	54,37 ± 6,86 ^{Aa}
CTLB	24,15 ± 7,82 ^{Aa}	34,57 ± 11,96 ^{Aa}	25,80 ± 6,36 ^{Aa}
GB	59,46 ± 16,19 ^{Aa}	47,94 ± 11,43 ^{Aa}	51,86 ± 11,58 ^{Aa}
Macrófagos pulmonares monócitos-like			
CD14 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	27,12 ± 12,80 ^{ABa}	25,25 ± 8,57 ^{Aa}	31,18 ± 1,43 ^{Aa}
GA	32,15 ± 7,84 ^{ABa}	25,58 ± 4,51 ^{Aa}	21,65 ± 2,31 ^{Ba}
CTLB	18,66 ± 5,28 ^{Ba}	31,18 ± 1,43 ^{Aa}	20,24 ± 2,48 ^{Ba}
GB	49,60 ± 8,69 ^{Aa}	26,39 ± 6,44 ^{Aab}	25,14 ± 3,32 ^{ABb}

(conclusão)

Neutrófilos			
CD14 ⁺ (%)	M1	M2	M3
CTLA	67,38 ± 2,11 ^{Aa}	71,38 ± 5,77 ^{Aa}	74,96 ± 3,24 ^{Aa}
GA	72,90 ± 2,78 ^{Aa}	75,15 ± 3,98 ^{Aa}	79,35 ± 5,31 ^{Aa}
CTLB	72,95 ± 4,90 ^{Aa}	74,96 ± 3,24 ^{Aa}	86,06 ± 3,80 ^{Aa}
GB	75,78 ± 3,14 ^{Aa}	79,96 ± 4,51 ^{Aa}	79,96 ± 0,98 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Ao se analisar a população de macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺, foi evidenciado que a média de GA foi menor que a do GB ($P = 0,02$) e apresentou tendência a ser menor que o CTLA ($P = 0,07$) no M3 (Gráfico 21).

Gráfico 21 - Valores médios e erros padrão da porcentagem de macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺ nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) no momento três (M3) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

A população de macrófagos pulmonares vacuolizados CD4⁺ dos animais do GA foi menor do que a do CTLA ($P = 0,04$) e do que o GB ($P = 0,05$) no M2 (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de macrófagos pulmonares vacuolizados $CD4^+$ nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos dois (M2; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Na análise da população de macrófagos pulmonares vacuolizados $CD8^+$ não foram evidenciadas diferenças entre os grupos.

Ao se avaliar a população de macrófagos pulmonares vacuolizados $CD4^+CD8^+$, foi verificado que a média do GB foi menor que a do CTLB ($P = 0,008$) e GA ($P = 0,007$) no M3 (Gráfico 23).

Gráfico 23 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de macrófagos pulmonares vacuolizados $CD4^+CD8^+$ nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos dois (M2; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes

Na avaliação da população de macrófagos pulmonares monócitos-like $CD14^+$, foi evidenciado que a média dos animais do GB diminuiu do M1 ao M3 ($P = 0,05$), porém foi maior que a do CTLB no M1 ($P = 0,03$). No M3, a média do GA foi menor que a do CTLA ($P = 0,009$), enquanto que esta última foi maior do que a do CTLB ($P = 0,005$) (Gráfico 24).

Gráfico 24 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de macrófagos pulmonares monócitos-like CD14⁺ nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) durante os três momentos experimentais (acima) e dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) no momento três (M3; abaixo) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

Não houve diferença entre as médias da população de neutrófilos CD14⁺ durante os momentos entre os grupos.

5.4.3 Avaliação funcional de fagócitos pulmonares

Na tabela 10 estão representados os valores médios percentuais e de média geométrica de intensidade de fluorescência referentes à quantificação das populações leucocitárias que produziram ERO intracelular nas amostras de LBA dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 10 - Médias das porcentagens, médias geométricas da intensidade de fluorescência em valores arbitrários e erros padrão da produção de espécies reativas de oxigênio basal por macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺, macrófagos pulmonares monócitos-like CD14⁺ e neutrófilos CD14⁺ no lavado broncoalveolar de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013

Macrófagos pulmonares vacuolizados CD14 ⁺			
Produção de ERO (%)	M1	M2	M3
CTLA	76,96 ± 5,88 ^{Aa}	82,30 ± 5,60 ^{Aa}	92,22 ± 4,01 ^{Aa}
GA	91,57 ± 4,50 ^{Aa}	80,65 ± 9,64 ^{Aa}	83,95 ± 5,58 ^{Aa}
CTLB	92,48 ± 4,38 ^{Aa}	92,22 ± 4,01 ^{Aa}	90,40 ± 3,73 ^{Aa}
GB	87,08 ± 6,95 ^{Aa}	98,50 ± 0,98 ^{Aa}	89,68 ± 2,56 ^{Aa}
Produção de ERO (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	199,1 ± 58,40 ^{Aa}	151,6 ± 40,70 ^{Aa}	482,0 ± 125,9 ^{Aa}
GA	447,8 ± 155,1 ^{Aa}	577,9 ± 332,7 ^{Aa}	464,7 ± 105,4 ^{Aa}
CTLB	437,0 ± 65,01 ^{Aa}	482,0 ± 125,9 ^{Aa}	255,2 ± 45,42 ^{Aa}
GB	480,8 ± 75,05 ^{Aa}	345,9 ± 71,50 ^{Ab}	242,0 ± 26,81 ^{Ab}
Macrófagos pulmonares monócitos-like CD14 ⁺			
Produção de ERO (%)	M1	M2	M3
CTLA	53,76 ± 9,65 ^{ABa}	43,94 ± 9,78 ^{Ba}	74,04 ± 6,74 ^{Aa}
GA	79,23 ± 7,49 ^{Aa}	69,12 ± 11,76 ^{ABab}	41,12 ± 9,39 ^{Bb}
CTLB	62,85 ± 17,73 ^{ABa}	74,04 ± 6,74 ^{Aa}	63,20 ± 5,81 ^{ABa}
GB	50,76 ± 9,69 ^{Ba}	82,30 ± 5,16 ^{ABb}	68,26 ± 3,03 ^{ABab}
Macrófagos pulmonares monócitos-like CD14 ⁺			
Produção de ERO (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	120,0 ± 52,75 ^{Aa}	91,56 ± 33,28 ^{Aa}	220,2 ± 67,19 ^{Aa}
GA	153,5 ± 33,39 ^{Aa}	196,0 ± 50,33 ^{Aa}	182,5 ± 20,24 ^{Aa}
CTLB	106,9 ± 7,53 ^{Aa}	220,2 ± 67,19 ^{Aa}	121,5 ± 31,02 ^{Aa}
GB	152,8 ± 59,93 ^{Aa}	125,1 ± 48,60 ^{Aa}	107,4 ± 27,73 ^{Aa}
Neutrófilos CD14 ⁺			
Produção de ERO (%)	M1	M2	M3
CTLA	10,00 ± 4,37 ^{Ba}	44,96 ± 18,16 ^{ABab}	79,52 ± 4,33 ^{Ab}
GA	39,16 ± 13,80 ^{ABa}	50,99 ± 18,76 ^{Aa}	58,97 ± 17,34 ^{Aa}
CTLB	62,33 ± 12,38 ^{Aa}	79,52 ± 4,33 ^{Aa}	82,22 ± 9,38 ^{Aa}
GB	37,54 ± 20,52 ^{ABa}	82,24 ± 12,29 ^{Aa}	90,92 ± 3,87 ^{Aa}
Produção de ERO (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	29,29 ± 9,53 ^{Ba}	64,05 ± 23,21 ^{Ba}	168,2 ± 26,65 ^{ABb}
GA	227,7 ± 165,6 ^{ABa}	116,2 ± 62,72 ^{ABa}	188,0 ± 25,29 ^{Aa}
CTLB	198,3 ± 22,05 ^{Aa}	168,2 ± 26,65 ^{Aa}	114,7 ± 26,62 ^{ABa}
GB	144,0 ± 62,87 ^{ABa}	156,8 ± 15,15 ^{ABa}	78,68 ± 9,34 ^{Ba}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. MGFI: média geométrica de intensidade de fluorescência de diclofluoresceína. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Com base nos resultados da tabela 10, foi constatado que a MGIF da produção de ERO por macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺ dos animais do GB foi maior no M1 que nos momentos M2 e M3 ($P = 0,01$) (Gráfico 25).

Gráfico 25 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺ que produziram ERO nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) durante os três momentos experimentais (acima) e dos grupos CTLA, CTLB-São Paulo – 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

Na avaliação da porcentagem de produção de ERO por macrófagos pulmonares monócitos-*like* CD14⁺ (Gráfico 26), foi verificado que a média do GA diminuiu ao longo dos momentos, onde M1 foi maior que M3 ($P = 0,03$), sendo maior que a média do GB no M1 ($P = 0,04$) e menor que a do CTLA no M3 ($P = 0,02$). A média do GB aumentou do M1 até o M2 ($P = 0,04$) e se manteve no M3. No M2, as médias dos controles foram diferentes, uma vez que a média do CTLB foi maior que a do CTLA ($P = 0,03$).

Gráfico 26 - Valores médios e erros padrão da porcentagem de macrófagos pulmonares monócitos-*like* CD14⁺ que produziram ERO nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e do CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

Não foi constatada nenhuma diferença na MGIF da produção de ERO por macrófagos pulmonares monócitos-*like* CD14⁺.

Ao se avaliar a produção de ERO por neutrófilos CD14⁻ (Gráfico 27), foi verificado que somente no CTLA a média aumentou ao longo dos momentos tanto em relação à porcentagem ($P = 0,06$) quanto à MGIF ($P = 0,002$). No M1, a média da porcentagem e a MGIF do CTLB foram maiores do que as do CTLA ($P = 0,02$). No M2, a MGIF de CTLB foi maior que a do CTLA ($P = 0,02$), enquanto que no M3 a MGIF do GB foi menor que a do grupo GA ($P = 0,005$).

Gráfico 27 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de neutrófilos CD14⁺ que produziram ERO nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos dois (M2; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

Na tabela 11 estão representados os valores médios percentuais e de média geométrica de intensidade de fluorescência referentes à quantificação das populações leucocitárias que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de LBA dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 11 - Médias das porcentagens, médias geométricas da intensidade de fluorescência em valores arbitrários e erros padrão de macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺, macrófagos pulmonares monócitos-like CD14⁺ e neutrófilos CD14⁺ que fagocitaram *Staphylococcus aureus* no lavado broncoalveolar de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

(continua)

Macrófagos pulmonares vacuolizados CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	40,34 ± 7,71 ^{ABa}	56,04 ± 5,33 ^{Aa}	54,06 ± 10,56 ^{Aa}
GA	61,08 ± 9,79 ^{ABa}	57,67 ± 7,40 ^{Aa}	65,27 ± 8,93 ^{Aa}
CTLB	44,63 ± 7,07 ^{Ba}	54,06 ± 10,56 ^{Aa}	45,52 ± 13,13 ^{Aa}
GB	78,60 ± 5,94 ^{Aa}	55,14 ± 9,33 ^{Aa}	50,72 ± 7,93 ^{Aa}
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	20,82 ± 2,08 ^{Ba}	19,70 ± 3,74 ^{Aa}	24,78 ± 3,47 ^{ABa}
GA	27,02 ± 3,47 ^{ABa}	43,08 ± 17,88 ^{Aa}	42,60 ± 7,65 ^{Aa}
CTLB	40,58 ± 7,86 ^{Aa}	24,78 ± 3,47 ^{Aa}	33,04 ± 2,12 ^{Aa}
GB	31,76 ± 2,98 ^{ABa}	44,74 ± 11,26 ^{Aa}	21,82 ± 2,76 ^{Ba}
Macrófagos pulmonares monócitos-like CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	48,88 ± 6,91 ^{Aa}	38,38 ± 7,63 ^{Aa}	43,92 ± 8,01 ^{Aa}
GA	53,32 ± 8,74 ^{Aa}	40,65 ± 2,39 ^{Aa}	54,78 ± 7,96 ^{Aa}
CTLB	47,88 ± 10,31 ^{Aa}	43,92 ± 8,01 ^{Aa}	48,18 ± 8,12 ^{Aa}
GB	59,48 ± 3,83 ^{Aa}	49,94 ± 8,44 ^{Aa}	45,38 ± 8,52 ^{Aa}
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	16,68 ± 2,10 ^{Aa}	14,32 ± 3,15 ^{Aa}	17,82 ± 2,11 ^{Ba}
GA	23,08 ± 2,50 ^{Aa}	26,08 ± 10,11 ^{Aa}	27,73 ± 2,75 ^{Aa}
CTLB	25,83 ± 4,40 ^{Aa}	17,82 ± 2,11 ^{Aa}	25,34 ± 1,80 ^{Aa}
GB	20,44 ± 1,84 ^{Aa}	30,10 ± 7,88 ^{Aa}	21,18 ± 3,39 ^{ABa}

(conclusão)

Neutrófilos CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	33,00 ± 9,02 ^{Aa}	29,96 ± 8,06 ^{Aa}	45,92 ± 6,45 ^{Aa}
GA	7,60 ± 3,77 ^{Bab}	33,29 ± 10,32 ^{Aa}	9,48 ± 9,48 ^{Bb}
CTLB	44,50 ± 9,70 ^{ABa}	45,92 ± 6,45 ^{Aa}	52,36 ± 5,40 ^{ABa}
GB	29,38 ± 13,97 ^{ABa}	42,12 ± 6,73 ^{Aa}	69,40 ± 6,96 ^{Aa}
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	19,16 ± 3,34 ^{Aa}	13,67 ± 2,29 ^{Aa}	16,68 ± 2,44 ^{ABa}
GA	6,90 ± 2,38 ^{Bab}	22,79 ± 7,64 ^{Aa}	2,94 ± 2,94 ^{Bb}
CTLB	37,40 ± 9,94 ^{Aa}	16,68 ± 2,44 ^{Aa}	23,68 ± 4,66 ^{ABa}
GB	9,10 ± 3,98 ^{Ba}	29,70 ± 8,58 ^{Aa}	18,72 ± 2,42 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B,C,D} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. MGIF: média geométrica de intensidade de fluorescência. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Ao se analisar a tabela 11, foi constatado que as médias percentuais e a MGIF da fagocitose de *S. aureus* por macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺ não mudou ao longo dos momentos em nenhum dos grupos, porém no M1 a média percentual do GB foi maior que a do CTLB ($P = 0,03$), ao mesmo tempo que a MGIF do CTLB foi maior que a do CTLA ($P = 0,03$). No M3, a MGIF do GB foi menor que a do CTLB ($P = 0,01$) e do GA ($P = 0,04$) (Gráfico 28).

Gráfico 28 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺ que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos um (M1; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

Em relação à população de macrófagos pulmonares monócitos-*like* CD14⁺, houve diferença no M3 quando a MGIF do GA foi maior que a do CTLA ($P = 0,02$) e este apresentou média menor do que a do CTLB ($P = 0,03$).

Na avaliação da população de neutrófilos CD14⁻ que fagocitaram *S. aureus*, foi constatado que a porcentagem desta função diminuiu no M3 do GA tanto em relação à porcentagem ($P = 0,02$) quanto à MGIF ($P = 0,03$). No M1, o GA apresentou média percentual ($P = 0,02$) e MGIF ($P = 0,01$) menores do que as do CTLA e a MGIF do GB foi menor que a do CTLB ($P = 0,03$). No M3, foi verificado que a média percentual de fagocitose do GA foi menor que a do CTLA ($P = 0,05$) e do que de GB ($P = 0,01$). Ao mesmo tempo que a MGIF no M3 do GA foi menor que a do GB ($P = 0,02$). Nesse mesmo momento, houve ainda uma tendência da MGIF de GA ser menor que a do CTLA ($P = 0,06$) (Gráfico 29).

Gráfico 29 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de neutrófilos CD14⁻ que fagocitaram *S. aureus* nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e do CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes.

Na tabela 12 estão representados os valores médios percentuais e de média geométrica de intensidade de fluorescência referentes à quantificação das populações leucocitárias que

fagocitaram *E. coli* nas amostras de LBA dos bezerros durante os três momentos experimentais.

Tabela 12 - Médias das porcentagens, médias geométricas da intensidade de fluorescência em valores arbitrários e erros padrão de macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺, macrófagos pulmonares monócitos-like CD14⁺ e neutrófilos CD14⁺ que fagocitaram *Escherichia coli* no lavado broncoalveolar de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo – 2013

Macrófagos pulmonares vacuolizados CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	22,81 ± 8,86 ^{ABa}	14,04 ± 1,08 ^{Ba}	20,57 ± 5,43 ^{Aa}
GA	25,08 ± 4,64 ^{ABa}	35,23 ± 5,29 ^{Aa}	23,54 ± 4,80 ^{Aa}
CTLB	4,75 ± 2,13 ^{Ba}	20,57 ± 5,43 ^{ABa}	14,68 ± 9,51 ^{Aa}
GB	31,40 ± 7,52 ^{Aa}	26,89 ± 9,59 ^{ABa}	24,93 ± 4,34 ^{Aa}
Fagocitose de <i>E. coli</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	14,14 ± 1,85 ^{Ba}	10,34 ± 1,04 ^{ABa}	12,64 ± 1,46 ^{Ba}
GA	16,27 ± 1,43 ^{ABa}	25,92 ± 7,79 ^{ABa}	30,97 ± 8,50 ^{ABa}
CTLB	38,80 ± 4,76 ^{Aa}	12,64 ± 1,46 ^{Bb}	36,80 ± 10,67 ^{Aab}
GB	17,66 ± 3,25 ^{Bb}	34,64 ± 6,01 ^{Aa}	10,51 ± 0,38 ^{Bb}
Macrófagos pulmonares monócitos-like CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	9,94 ± 6,44 ^{Aa}	3,11 ± 0,90 ^{Aa}	10,09 ± 4,34 ^{Aa}
GA	14,57 ± 3,39 ^{Aa}	17,21 ± 4,56 ^{Ba}	11,84 ± 4,08 ^{Aa}
CTLB	2,11 ± 1,17 ^{Aa}	10,09 ± 4,34 ^{ABa}	14,88 ± 6,86 ^{Aa}
GB	9,41 ± 2,99 ^{Aa}	14,81 ± 6,79 ^{ABa}	12,69 ± 2,32 ^{Aa}
Fagocitose de <i>E. coli</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	10,69 ± 1,72 ^{Ba}	8,57 ± 1,80 ^{Aa}	11,79 ± 1,89 ^{ABa}
GA	13,80 ± 1,41 ^{ABa}	17,79 ± 5,32 ^{Aa}	20,39 ± 4,09 ^{Aa}
CTLB	23,53 ± 1,88 ^{Aa}	11,79 ± 1,89 ^{Ab}	17,16 ± 3,37 ^{ABab}
GB	13,83 ± 3,11 ^{ABa}	26,41 ± 7,10 ^{Aa}	10,34 ± 0,28 ^{Ba}
Neutrófilos CD14 ⁺			
Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	M1	M2	M3
CTLA	12,77 ± 5,35 ^{Aa}	7,08 ± 2,20 ^{Aa}	6,23 ± 0,91 ^{Aa}
GA	5,21 ± 2,75 ^{Aab}	13,40 ± 4,91 ^{Aa}	0,30 ± 0,30 ^{Bb}
CTLB	9,77 ± 2,03 ^{Aa}	6,23 ± 0,91 ^{Aa}	5,53 ± 2,43 ^{ABa}
GB	13,01 ± 6,55 ^{Aa}	4,00 ± 0,87 ^{Aa}	4,65 ± 0,77 ^{Aa}
Fagocitose de <i>E. coli</i> (MGIF)	M1	M2	M3
CTLA	15,26 ± 1,60 ^{Ba}	12,15 ± 1,76 ^{Aa}	17,33 ± 3,64 ^{Aa}
GA	10,54 ± 4,21 ^{ABab}	19,34 ± 6,51 ^{Aa}	10,54 ± 4,21 ^{Ab}
CTLB	31,70 ± 6,01 ^{Aa}	17,33 ± 3,64 ^{Aa}	21,94 ± 4,71 ^{Aa}
GB	6,82 ± 2,80 ^{Ba}	30,36 ± 7,86 ^{Ab}	14,12 ± 1,48 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b,c} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. MGIF: média geométrica de intensidade de fluorescência. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Ao se analisar a tabela 12, foi constatado que a MGIF da fagocitose de *E. coli* por macrófagos pulmonares vacuolizados CD14⁺ do GB aumentou no M2 porém diminuiu no M3 ($P = 0,01$) diferindo do CTLB. No M1, a MGIF do GB ($P = 0,03$) foi menor que a do CTLB, aumentou no M2 ($P = 0,007$) e voltou a diminuir no M3 ($P = 0,04$), sempre diferindo do

CTLB. Em relação ao grupo GA, a média percentual de fagocitose de foi maior que a do CTLA ($P = 0,006$), porém se igualou ao CTLA no M3 (Gráfico 30).

Gráfico 30 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de macrófagos pulmonares vacuolizados $CD14^+$ que fagocitaram *E. coli* nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e do CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

Em relação à população de macrófagos pulmonares monócitos-*like* $CD14^+$ não houve diferença na MGIF de fagocitose do GB. No M1, houve somente diferença entre as MGIF dos controles CTLA e CTLB ($P = 0,03$). No M2, a média percentual de fagocitose do GA foi maior que a do CTLA ($P = 0,02$), porém se igualou ao CTLA no M3. No M3, a MGIF do GB foi menor que a do GA ($P = 0,05$) e GB apresentou tendência a ser menor do que o CTLB ($P = 0,08$) (Gráfico 31).

Gráfico 31 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de macrófagos pulmonares monócitos-like CD14⁺ que fagocitaram *E. coli* nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) nos momentos dois (M2; esquerda) e três (M3; direita) - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes.

Na avaliação da população de neutrófilos CD14⁺ que fagocitaram *E. coli*, a média percentual do GA caiu no M3 em relação aos momentos anteriores ($P = 0,02$) e a MGIF do M3 foi menor que a do M2 ($P = 0,05$). A MGIF do GB, aumentou do M1 ao M2, porém caiu no M3 ($P = 0,02$). No M1, a MGIF do GB foi menor que a do CTLB ($P = 0,02$), havendo diferenças também entre os controles CTLA e CTLB ($P = 0,02$). No M3, a média percentual do GA foi menor que a do CTLA ($P = 0,004$) e do GB ($P = 0,005$) (Gráficos 32 e 33).

Gráfico 32 - Médias geométricas de intensidade de fluorescência e erros padrão de neutrófilos CD14⁺ que fagocitaram *E. coli* nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (caixa branca) e GA (caixa cinza) acima e do CTLB (caixa branca) e GB (caixa cinza) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo.

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

Gráfico 33 - Valores médios e erros padrão das porcentagens de neutrófilos CD14⁺ que fagocitaram *E. coli* nas amostras de lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA, CTLB (caixa branca), GA e GB (caixa cinza) no momento três (M3) - São Paulo - 2013.

Fonte: Gomes (2013)

* indicam $P \leq 0,05$ no mesmo momento de grupos diferentes.

5.4.3 Pesquisa de IgA local

Na tabela 13 estão representados os valores médios e erros padrão da concentração de IgA no LBA do bezerros nos três momentos experimentais.

Tabela 13 - Médias e erros padrão da concentração de imunoglobulina A (IgA) em ng/mL no lavado broncoalveolar de bezerros durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

	M1	M2	M3
CTLA	36,25 ± 15,91 ^{ABa}	67,94 ± 20,67 ^{Aa}	112,7 ± 34,33 ^{Aa}
GA	15,93 ± 8,60 ^{Ba}	87,87 ± 32,35 ^{Aab}	125,2 ± 60,56 ^{Ab}
CTLB	58,29 ± 19,08 ^{ABa}	112,7 ± 34,33 ^{Aa}	71,33 ± 35,99 ^{Aa}
GB	108,7 ± 40,68 ^{Aa}	229,4 ± 118,6 ^{Aa}	167,0 ± 43,38 ^{Aa}

Fonte: Gomes (2013)

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas^{A,B} dentro de uma mesma coluna ou letras minúsculas diferentes sobrescritas^{a,b} dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os valores. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média. CTLA: grupo controle de GA (bezerros não-vacinados); GA: grupo A (primeira dose da vacina aos 15 dias de idade); CTLB: grupo controle de GB (bezerros não-vacinados); GB: grupo B (primeira dose da vacina aos 45 dias de idade). M1: 15 dias de idade (CTLA e GA) ou 45 dias de idade (CTLB e GB) e primeira dose da vacina para GA e GB; M2: 21 dias após o M1 e a segunda dose da vacina para GA e GB; M3: 21 dias após M2. Não foram consideradas as comparações entre os grupos GA com CTLB nem, GB com CTLA.

Foi observado com os resultados da tabela 13 que a concentração de IgA aumentou ($P = 0,02$) nos animais do GA no M3 em relação ao M1 e tendeu a aumentar ($P = 0,06$) no GB no M3 (Gráfico 34)

Gráfico 34 - Valores médios em ng/mL e erros padrão da concentração de imunoglobulina A (IgA) no lavado broncoalveolar de bezerros dos grupos CTLA (bola preta) e GA (bola branca) acima e dos grupos CTLB (bola preta) e GB (bola branca) abaixo durante os três momentos experimentais - São Paulo - 2013

Fonte: Gomes (2013)

^{a,b} indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos de um mesmo grupo

T indica tendência ($0,1 > P > 0,05$) entre o mesmo momento de grupos diferentes

6 DISCUSSÃO

O estado imaturo do sistema imune do neonato é frequentemente citado como uma das razões que a vacinação não induz resposta protetiva e é a base para protocolos vacinais que recomendam imunizações múltiplas (GRIEBEL, 2009). A constante transformação do sistema imune dos bezerros nos primeiros meses de vida, em particular, dos mecanismos de defesa respiratórios (BERTAGNON et al., 2007; BATISTA et al., 2012, 2015; BERTAGNON, 2015) torna-os mais susceptíveis ao CDRB. O conhecimento do limiar estreito da resposta vacinal nesse período é fundamental e foi o objetivo desse trabalho, levando em consideração não apenas a faixa etária, como a via de aplicação, o risco de infecção e o perfil das vacinas disponíveis. A hipótese do trabalho foi confirmada ao se concluir que existe influência etária na resposta à vacina utilizada por via intranasal, e ainda, que bezerros vacinados principalmente aos 15 dias de idade se tornam mais susceptíveis a infecções bacterianas secundárias.

As idades dos bezerros desse estudo foram definidas de acordo com estudos prévios realizados com o objetivo de avaliar a influência etária na resposta vacinal ou a patógenos (GRELL et al., 2005; ELLIS et al., 2007). Não foi possível realizar o controle de qualidade do colostro uma vez que a primeira mamada foi fornecida na propriedade pelos funcionários da fazenda, no entanto a transferência de imunidade passiva foi comprovada por meio dos critérios de inclusão citados na seção material e métodos. Contudo, os animais receberam na FMVZ iguais quantidade de colostro aquecido provenientes de banco de colostro congelado, o que os submeteu a semelhantes condições de manejo.

O interesse pelo tema surgiu como complementariedade de outros trabalhos realizados pela equipe que avaliam o sistema imune inato e adaptativo do sistema respiratório de bezerros saudáveis (BATISTA et al., 2012, 2015; BERTAGNON, 2015) e infectados experimentalmente com *M. haemolytica* (BATISTA, 2015).

6.1 EXAME CLÍNICO GERAL E EXAME ESPECÍFICO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

As características contidas no exame clínico geral, como postura, comportamento, estado nutricional, condição física, frequência respiratória, pulsação e temperatura corporal,

são essenciais para indicar se a saúde do animal está alterada e direcionar o médico veterinário para um exame específico mais minucioso. Os indícios de doença respiratória na anamnese são apresentados por meio da presença de corrimento ou sangramento nasal, tosse ou outros ruídos respiratórios, falta de ar ou respiração curta e cansaço rápido, associados a aumento da frequência respiratória e da temperatura corporal (DIRKSEN; GRUNDER; STOBER, 1993; GONÇALVES; FEITOSA, 2008). Dada a importância da afecção para o sistema de produção, algumas propostas de diagnóstico empregando escores tem sido proposta (MCGUIRK; PEEK, 2014; UW, 2015)

No presente estudo, apesar de alguns animais não vacinados terem apresentado manifestações clínicas características de afecção respiratória, a maioria dessas manifestações ocorreram em animais dos grupos GA e GB após a vacinação, os quais apresentaram secreção pulmonar evidente pela endoscopia, crepitação pulmonar à auscultação, respiração polipnéica e rude e reflexo de tosse positivo. A presença de secreção pulmonar avaliada pela endoscopia e representada por escores nos animais após a vacinação foi sugestiva de efeito adverso da vacina, no entanto como os animais controle também apresentaram secreção após dos 57 dias de idade (M3 do CTLA e M2 e M3 do CTLB), suspeita-se que nesse período os animais estejam sujeitos a maior desafio ambiental, independentemente da vacinação. Apesar disso, nos animais do GA essa predisposição foi antecipada pela vacina. A correlação entre vacinação e secreção pulmonar alterada seria possível por meio do isolamento de patógenos na secreção pulmonar, mas para isso seria necessária a colheita de lavado traqueobrônquico (GONÇALVES, 1997; BERTAGNON et al., 2011; BENESI et al., 2012) para a obtenção de amostras estéreis, o que não foi incluso no delineamento experimental.

De forma equivalente, ao avaliar os efeitos de uma única dose intranasal de vacina univalente com VSRB³⁹ vivo modificado em bezerros holandeses de quatro a seis semanas de idade, foi observado que a vacina mesmo sendo de alta passagem e baixa virulência, induziu febre de mais de 40 °C e sons ásperos no pulmão sete dias após a vacinação. Esses animais foram desafiados com o VSRB 30 dias após a vacinação e embora não tenham apresentado mais manifestações clínicas de doença após o desafio, a vacina não preveniu completamente o desenvolvimento de lesão grave ou replicação do vírus no pulmão (WOOLUMS et al., 2004).

Provavelmente, se os animais vacinados tivessem sido desafiados após a vacinação com algum dos vírus da vacina ou com uma bactéria oportunista como a *M. haemolytica*, os resultados seriam mais esclarecedores, no entanto o inóculo não foi delineado.

³⁹ VT-794, American Type Culture Collection, Manassas, Va.

O uso de vacinas com VDVB vivo modificado foi inicialmente recomendado em bovinos jovens e seu uso em animais prenhes foi desencorajado pela possibilidade de induzir o aborto. Ressalvas foram levantadas a respeito destas vacinas quando foi notado que seu uso resultou em pequena porcentagem de animais que desenvolveram doença das mucosas pós-vacinal (*pvMD- post vaccinal mucosal disease*) (RIDPATH; BOLIN, 1995; RIDPATH, 2013). Neste momento, as sequelas da doença não tinham sido estabelecidas, mas posteriormente, foi demonstrado que somente os animais persistentemente infectados com VDVB sucumbiram à *pvMD*. Por esta razão, a vacinação de animais persistentemente infectados com vacinas vivas modificadas contendo o VDVB deve ser evitada (RIDPATH, 2013). Além disso, houve uma preocupação de que as vacinas com VDVB vivo modificado poderiam estar associadas à imunossupressão (MARTIN et al., 1980; ROTH; KAEBERLE, 1983).

Estas preocupações levaram ao desenvolvimento de vacinas com VDVB morto e, ao final dos anos 80, a maioria das principais empresas de produtos biológicos ofereciam ambas as linhas de vacinas vivas mortas e modificadas (RIDPATH, 2013).

No estudo em questão, a vacina polivalente utilizada provavelmente contém estirpes e adjuvantes distintos das empregadas nos estudos citados acima. O VDVB da vacina adotada por ser um vírus morto não é comparável aos efeitos de doença das mucosas pós-vacinal observados por Ridpath e Bolin (1995) e Ridpath (2013). No entanto, a vacina é composta pelo VSRB vivo modificado e por cepas quimicamente alteradas de HVB e PI-3.

Discordando dos resultados encontrados, Platt et al. (2009) não observaram mudanças significativas em temperatura retal e escore clínico, incluindo neste alterações como depressão, anorexia, descargas nasal e ocular, sinais respiratórios, tosse e diarreia, em bezerros vacinados por via subcutânea com vacina comercial viva modificada contendo VDVB-1 (estirpe Singer), VDVB-2 (estirpe Bolin 296), HVB-1 (estirpe Colorado), VSRB (estirpe proprietária) e PI-3 (estirpe proprietária) com adjuvante próprio⁴⁰. Provavelmente, estes autores não encontraram ocorrência de manifestações clínicas respiratórias, pois utilizaram a via subcutânea.

Da forma semelhante a Platt et al. (2009) e em desacordo com os resultados encontrados, Ellis et al (2007) também não observaram alterações clínicas em bezerros dessa vez vacinados intranasalmente com três diferentes protocolos a partir da segunda semana de vida. O primeiro protocolo foi definido pela utilização de vacina comercial univalente⁴¹

⁴⁰ Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO

⁴¹ Bovishield BRSV, Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Mich

contendo VSRB vivo modificado, o segundo por uma vacina polivalente⁴² viva modificada contendo VSRB, PI-3, HVB-1 e VDVB e o terceiro por uma vacina polivalente contendo os mesmos vírus exceto o VSRB⁴³. No entanto, como os autores coletaram dados clínicos somente um dia antes do desafio viral, ou seja, 21 dias após a segunda dose vacinal, não se sabe se os animais apresentaram sintomatologia respiratória após a vacinação. Mais uma vez, os resultados da presente pesquisa poderiam ser comparados a esta caso tivesse sido feito o desafio viral após a vacinação.

Deve ser notado que, embora os princípios da vacinação sejam estudados há muitos anos, as mudanças constantes nos componentes e protocolos vacinais incitam pesquisas que objetivam a melhoria na sua eficácia e segurança. Para se certificar que os riscos da vacinação não excedam às chances de se contrair a própria doença é essencial que sejam realizadas pesquisas clínicas com os componentes vacinais isolados e associados, considerando estirpes, adjuvantes, vias e idades uma vez que não se sabe qual a interferência que um componente pode causar no outro. Nos animais deste estudo, para se confirmar que as manifestações clínicas eram decorrentes dos agentes vacinais, seria necessário o isolamento dos patógenos contidos na vacina em secreções de mucosa nasal ou pulmonar.

6.2 LEUCOGRAMA

Ao se comparar os valores absolutos com os de referência da literatura (BIRGEL, 1982; WOOD; QUIROZ - ROCHA, 2010), foi constatado que nos animais do GA os valores estavam dentro do normal dos valores de referência propostos para a espécie e do GB apresentaram valores médios de leucocitose por neutrofilia em todos os momentos. Em virtude de esse achado ter sido verificado desde o começo do experimento e antes da primeira dose vacinal, não foi relacionado com a vacinação. Foi também evidenciada linfocitose no GB (M1 e M2), porém coincidiu com a linfocitose do seu controle CTLB no M2, tendo assim relação com a variação etária de animais saudáveis. Ao se comparar estatisticamente os grupos, foi observada diminuição do valor absoluto de leucócitos e linfócitos do GA a partir do M2. Este dado sugere diminuição da resposta celular por linfócitos nos animais do GA após a primeira dose vacinal.

⁴² Bovishield4, Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Mich

⁴³ Bovishield3, Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Mich

A resposta imune é complexa com diversos componentes inatos e adaptativos necessários para conferir imunidade após infecção ou vacinação. A contagem de glóbulos brancos (leucócitos totais) e suas subpopulações (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) servem como medidas objetivas da imunidade inata ou adaptativa, fornecendo informações sobre a variação da resposta imune à vacinação ou doença respiratória e potencial de resistência de um animal ao CDRB (LEACH et al., 2013). Nos animais avaliados, o GA, portanto, apresentou diminuição da resposta linfocítica à vacina ao se analisar o hemograma.

Leach et al. (2013), ao vacinarem bovinos de 60 dias de idade com vacina polivalente⁴⁴ contendo VSRB, VDVB, HVB e PI-3 vivos modificados por via intramuscular e reforço aos 139 dias, também notaram redução média nos linfócitos e sugeriram que a resposta imune adaptativa para as vacinas decaiu na segunda dose pelo fato do organismo ter tido tempo para produzir resposta imunológica de memória. De fato, foi observado em outros trabalhos que a indução de resposta imune por anticorpos para esses vírus varia entre duas a três semanas após a infecção viral ou vacinação (BOLIN; RIDPATH, 1989; BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; TIKOO, 1996; GERSHWIN, 2012), portanto a imunidade celular dos animais do presente estudo também pode ter apresentado declínio a medida que os níveis de anticorpos aumentaram.

Leach et al. (2013) buscaram ainda correlacionar o ganho de peso médio diário (*ADG - average daily gain*), registros de saúde (*HR - health records*) e escores de lesões pulmonares (*LS - lung scores*) indicativos de CDRB, com a resposta imune do leucograma, com o objetivo de encontrar parâmetro facilmente mensurável que poderia ser utilizado como bom preditor da resistência ao CDRB após a vacinação. Os resultados indicaram correlação positiva entre os índices listados e a resposta imune inata (eosinófilos, basófilos, neutrófilos), e negativa para a adaptativa (linfócitos). No entanto, os autores ainda obtiveram correlação genética significativa entre a contagem de eosinófilos antes do reforço vacinal com o *HR* após a vacinação. Mostraram ainda que mudanças na quantidade de leucócitos totais e concentração de linfócitos no reforço vacinal estão correlacionadas com a saúde em curso do animal e com o potencial de seleção genética com base na resposta imunológica (LEACH et al., 2013). Diante de uma avaliação baseada na dependência genética dos animais para a competência imunológica, seria necessária a avaliação de bezerros individualmente, o que tornaria a aplicabilidade do estudo bastante reduzida, uma vez que as vacinas são empregadas em rebanhos, e não em somente um indivíduo.

⁴⁴ Vista Once SQ ou Merck Visa 5 SQ

Diante do exposto, a avaliação da resposta imunológica, seja por meio do leucograma ou análises mais específicas, deve ser considerada em conjunto com outros aspectos além da idade, componentes da vacina e via de aplicação. Devem ser considerados também, fatores intrínsecos relacionados à saúde do animal que podem interferir na resposta vacinal. Apesar disso, o declínio de leucócitos totais e linfócitos no GA, indica diminuição de resposta celular, porém é necessária a diferenciação entre linfócitos B e T para maiores detalhes sobre o tipo de resposta, o que foi possível por meio da imunofenotipagem realizada por citometria de fluxo.

6.3 CITOLOGIA DO LBA

Analisando-se a citologia do trato respiratório dos bezerros constatou-se a predominância de macrófagos alveolares, seguida por neutrófilos e pequenas proporções de células gigantes, eosinófilos e células ciliadas em animais dos grupos controle e do GB em todos os momentos experimentais, concordando com os achados de Pringle et al. (1988), Barros et al. (1994); Gonçalves et al. (2004) e Griffin et al. (2010).

Porém, foi evidenciado que a porcentagem média de macrófagos dos animais do GA diminuiu e a de neutrófilos aumentou ao longo dos momentos, corroborando com Taylor, Thomas e Stott (1989) ao contrastarem resultados de citologia do LBA antes e após a inoculação viral em animais não vacinados com animais recém-vacinados aos cinco meses de idade com vacina contendo o VSRB inativado por via subcutânea. O resultado demonstrou que anteriormente ao desafio viral, os animais apresentavam um predomínio em torno de 85% de macrófagos em relação a neutrófilos, contudo após a inoculação o perfil se alterou para iguais porcentagens de 45% de macrófagos e neutrófilos em animais vacinados. Nos animais não vacinados, a porcentagem de neutrófilos superou a de macrófagos alveolares, o que os fez concluir que a vacina atenuou a resposta inflamatória. Nos resultados do presente estudo, não se pode supor que a vacina atenuou uma possível inflamação somente pela avaliação da citologia do LBA, mas associado às manifestações clínicas, leucograma e presença de citocinas pró-inflamatórias. Apesar desta não ter sido realizada, os animais dos grupos GA e GB apresentaram manifestações clínicas, ademais foi evidenciado leucograma com neutrofilia no GB citologia do LBA com predomínio de neutrófilos no GA após a vacinação. Esses resultados dão indícios de uma resposta inflamatória após a vacinação.

No entanto, a magnitude de aumento neutrofílico no trato respiratório pode não ser representativa de broncopneumonia, assim como concluído por Gonçalves et al. (2011), já que devido a imaturidade imune, neonatos bovinos montaram uma resposta inflamatória com grande influxo celular, menos severa e com pouca sintomatologia, em decorrência da menor eficiência celular. Os animais mais velhos recrutam menor número de neutrófilos, que são mais eficientes na eliminação dos patógenos, porém mais danosa ao tecido hospedeiro (GRELL et al., 2005; BATISTA et al., 2012). Por certo, foi observado que os animais dos grupos controles (CTLA e CTLB) apesar de não apresentarem diferença na citologia do LBA, apresentaram manifestações clínicas após 57 dias de idade provavelmente por desafio ambiental e resposta imune diversa da observada antes dessa idade. Dessa forma, para que se tenha segurança em afirmar a inflamação seriam necessárias outras avaliações, como expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IFN γ , ou dosagem de proteínas de fase aguda.

Da mesma forma, permite-se inferir que animais mais novos respondem com maior número de neutrófilos à imunização por via intranasal do que animais mais velhos, no entanto para se avaliar se essa resposta foi danosa ao animal, é necessária a avaliação da intensidade de produção de citocinas, como o IFN γ desses animais em relação aos do grupo controle, já que o IFN γ é liberado por vários tipos de células durante infecções virais e em respostas vacinais (WOOLUMS et al., 2004; ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Ao levar em consideração que os neutrófilos são as células mais rapidamente recrutadas e que podem gerar um grande número de produtos inflamatórios, incluindo oxidantes e enzimas proteolíticas (DONNELLY; HASLETT, 1992), as quais podem exacerbar a inflamação pulmonar bem como as manifestações clínicas (FADEN; OGRA, 1986; DONNELLY; HASLETT, 1992) e que a atuação dos neutrófilos não é a mais eficiente para a neutralização viral, mas sim a ação dos linfócitos, é sugestivo que quanto maior a resposta neutrofílica à vacina, menor será a linfocítica, denotando, portanto o animal menos competente imunologicamente.

Por outro lado, os neutrófilos possuem atribuições que ainda estão sendo descobertas podendo ter importante atuação na interlocução entre os sistemas imunes inato e adaptativo (WHALE; GRIEBEL, 2009), descrito a seguir.

A partir de avaliações dos resultados de exame clínico, leucograma e citologia do LBA, foi entendido que a vacina teve maior influência maior sobre os animais do GA, uma vez que alterou todos esses parâmetros. Os resultados induziram a suspeita de que a vacina tenha causado efeito adverso pela diminuição de linfócitos sistêmicos e aumento de

neutrófilos locais do GA. Pressupõe-se, no entanto que, devido a faixa etária a ação neutrofílica seja também importante para a resposta vacinal devido à imaturidade imunológica mais intensa dos animais do GA.

6.4 IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS E PULMONARES

A seguir serão discutidos os resultados de imunofetipagem dos leucócitos polimorfonucleares e mononucleares do sangue e LBA.

6.4.1 Células polimorfonucleares

Foi observado que a população de neutrófilos (CH138⁺) no sangue dos animais do GA foi maior que o CTLA após a primeira dose vacinal (M2) coincidindo com a tendência ao aumento de neutrófilos nos resultados de hemograma do GB (M3) e na citologia de LBA do GA do M1 ao M3.

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa da imunidade inata contra doenças infecciosas. No entanto, desde a sua descoberta por Elie Metchnikoff, sempre foram consideradas como células destruidoras de tecido responsáveis por danos inflamatórios durante infecções agudas. Atualmente, uma extensa variedade de pesquisas no campo da biologia celular de neutrófilos e o seu papel no desvio da resposta imunológica a várias infecções ou doenças inflamatórias revelaram a sua importância na regulação da resposta imune (KUMAR; SHARMA, 2010).

Whale e Griebel (2009) denominaram os neutrófilos como “um lobo em pele de cordeiro”. Esta analogia surgiu pelo fato de ter sido demonstrado que os neutrófilos são capazes de incorporar fragmentos de membranas celulares e proteínas integrais de membrana decorrentes de uma variedade de mecanismos e condições tais como inflamação, morte celular, ou estresse celular e que as membranas ou proteínas passivamente adquiridas podem alterar a função da célula receptora. Essa atribuição do neutrófilo é vantajosa para a resposta imune precoce de bezerros, uma vez que esta foi caracterizada como neutrofílica pelo

leucograma dos animais do GB e pela citologia e imunofenotipagem do LBA dos animais do GA.

Apesar de essa capacidade não ser exclusiva do neutrófilo, como são frequentemente as primeiras células recrutadas para os locais de inflamação, sua chance de adquirir proteínas de membrana desligadas por uma variedade de células é bem maior (WHALE; GRIEBEL, 2009). Isso chama atenção para a importância dessa população de células, até mesmo em resposta vacinais ou a infecções virais em que são mais exploradas as respostas por linfócitos e por anticorpos. Uma vez que o neutrófilo incorporar a membrana de uma célula com função específica antiviral, linfócitos por exemplo, a avaliação da resposta imune ao patógeno deve ser considerada não só por meio de linfócitos, como de neutrófilos também.

Isto é especialmente importante ao perceber que a aquisição passiva de proteínas de membrana altera a capacidade da célula receptora de serem infectadas por um vírus (TABIASCO et al., 2002). Observações semelhantes foram relatadas em neutrófilos bovinos após a sua incubação com membranas plasmáticas purificadas (WHALE et al., 2006b). A porcentagem de células mononucleares e de neutrófilos bovinos infectados com adenovírus-3 aumentou de três a cinco vezes após a incubação de neutrófilos com membranas isoladas a partir de uma linha celular de fibroblastos permissiva para a infecção viral. Em contraste, a incubação de neutrófilos com membranas isoladas a partir de células não permissivas não alterou a porcentagem de células afetadas. Estas observações apoiam a sugestão de que a transferência de proteína de membrana pode aumentar a susceptibilidade à infecção viral nos leucócitos de destino. Deve ser avaliado se existe essa possibilidade do antígeno vacinal capaz se replicar nos neutrófilos, o que seria prejudicial já que a tomada de decisão na implementação da vacinação contra o CDRB é geralmente feita em rebanhos com alta incidência da doença.

A replicação do vírus dentro de neutrófilos pode servir para amplificar, e por meio da migração de neutrófilos, disseminar a infecção. Por outro lado, a expressão da proteína viral dentro de neutrófilos também pode potencializar a indução de resposta imune por interações com células dendríticas no local de infecção ou drenar o antígeno para linfonodos, indisponibilizando o antígeno solúvel no organismo (GRETZ et al., 2000). É importante lembrar que o NALT tem papel importante na resposta aos antígenos vacinais e, portanto são alvos de pesquisa ao se utilizar a via intranasal. Provavelmente, nos animais do presente estudo existiu migração de neutrófilos portadores de proteína viral para o NALT levando à possível indução de IgA local.

No entanto, as consequências de tropismo viral alterado dependem da resposta dos neutrófilos à infecção. Por exemplo, se a infecção viral resulta em apoptose, então este pode ser um mecanismo por meio do qual os agentes patogênicos eliminam neutrófilos, o que pode contribuir para citotoxicidade anticorpo-dependente mediada por células no local da infecção (ROUSE et al., 1977).

Os neutrófilos podem, assim, ter um papel na integração dos sistemas imunes inato e adaptativo e a sua abundância no sangue os torna a população ideal em animais domésticos no segmento de uma nova vacina ou na criação de terapia imune *ex vivo* (WHALE; GRIEBEL, 2009). Além disso, deve ser dada maior importância em protocolos vacinais convencionais à presença dos neutrófilos e ao que ela representa na prevenção à doença.

Possivelmente, a migração de neutrófilos está relacionado com a expressão aumentada de *TLR* nos animais vacinados (BARTON, 2007; BASTO; LEITÃO, 2014; MARIN et al., 2014).

O desenho racional de vacinas tem sido acelerado pela descoberta de agonistas específicos *TLR* que podem ser usados para influenciar a dimensão e qualidade da resposta imunitária. Agonistas específicos *TLR*, como o lipopolissacarídeo, induzem a produção de quimiocinas que recrutam seletivamente neutrófilos e outros granulócitos (GRIEBEL et al., 2005). Dado que os neutrófilos podem funcionar diretamente como células apresentadoras de antígenos ou desempenham papel no recrutamento e ativação de células dendríticas, o papel dos neutrófilos no local de administração da vacina requer avaliação cuidadosa. Apesar do aumento no recrutamento de neutrófilos no local poder melhorar a qualidade e a magnitude de respostas de células T e B (ROMANI et al., 1997; TATEDA et al., 2001), assumiu-se que a presença de neutrófilos, que podem fagocitar e degradar os antígenos da vacina, é contraproducente na indução de uma resposta imunitária adaptativa (GRIEBEL et al., 2005).

A indução da resposta neutrofílica no sangue e no LBA nos animais do GA bem como no sangue dos animais do GB pode ser considerada favorável para a resposta vacinal, uma vez que dados indicam que os neutrófilos têm a capacidade de sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, e quimiocinas imunorreguladoras, que podem afetar o equilíbrio da resposta Th1/Th2 do hospedeiro (BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999).

Como as infecções virais e vacinas destinadas a induzir uma resposta imune protetora devem conduzir a resposta Th1 (GERSHWIN, 2012) e bezerros nascem com predomínio de resposta Th2 devido à produção de hormônios e citocinas anti-inflamatórias pela placenta suprimindo as respostas mediadas por células (Th1), (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002), a ação de neutrófilos nos bezerros vacinados nas idades definidas pelo

presente estudo contribuem para a resposta vacinal, desde que não tenha possibilitado a replicação viral por meio de transferência de proteína de membrana, o que aumentaria a susceptibilidade à infecção viral (WHALE et al., 2006b).

Como nos primeiros meses, os bezerros apresentam intensa variação na resposta celular, diferenças podem ser encontradas ainda antes dos 15 dias de idade, proposto para o GA. Antonis et al. (2010) estudaram o efeito da idade em parâmetros imunológicos da doença por VSRB em bezerros recém-nascidos (um dia de idade) e jovens (seis semanas de idade). Contrário ao encontrado na resposta vacinal dos bezerros do GA, bezerros neonatos tiveram menor resposta pró-inflamatória local do que bezerros de seis semanas de idade, em particular em relação à infiltração neutrofílica no pulmão, à concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), à resposta imune humoral específica e aos sinais clínicos de doença. Contudo, neonatos apresentaram replicação viral mais extensa e consolidação de pulmão. A falta de correlação entre a replicação do vírus e as manifestações clínicas sugere o papel importante de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , na doença, uma vez que a capacidade de produção de TNF- α pró-inflamatória parece aumentar com a idade.

Contudo, a resposta demonstrada por Antonis et al. (2010) foi específica para o VSRB infectante, enquanto a vacina utilizada contém cinco agentes virais e cepas bacterianas, teoricamente não infectantes e que induzem a montagem de uma resposta mais complexa.

6.4.2 Células mononucleares

Além dos neutrófilos, os macrófagos ou monócitos atuam como células apresentadoras de antígenos. A identificação dos macrófagos, nos tecidos, ou dos monócitos, no sangue, foi feita pela marcação da molécula CD14 observada em maior proporção em células da linhagem monocítica-macrofágica e está envolvida em uma série de respostas imunológicas, chave no reconhecimento de patógenos invasores e no desencadeamento da cascata de reações inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2014). Apesar de também ser expressa por células polimorfonucleares (BURTON; ERSKINE, 2003; LEE et al., 2003; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006). Piepers et al. (2009) observaram que apenas 3% das células positivas para CD14 foram encontradas no *gate* de células polimorfonucleares.

O aumento de monócitos CD14⁺ concomitante ao de linfócitos TCD3⁺CD4⁻CD8⁻ sanguíneos implica mais uma vez, como foi observado na discussão da ação dos neutrófilos, a relação entre os sistemas imune inato e adaptativo. Por outro lado, a diminuição de

macrófagos alveolares e ausência de alteração na porcentagem de células $CD4^+CD8^-$ do LBA indica a diferença entre as respostas imunes sistêmica e local.

Ainda que não tenha sido utilizada marcação específica, o fenótipo $CD4^+CD8^-$, duplo-negativas, foi demonstrado como característico de células T NK (DASHTSOODOL et al., 2008; TIZARD, 2014), que quando ativadas atuam como fonte inicial importante de $IFN\gamma$ na maior parte das infecções virais causando inibição do crescimento de células infectadas e promoção da apoptose, restringindo assim a propagação do vírus, Isto foi evidenciado em ratos infectados com vírus sincicial respiratório que após três dias apresentaram aumento de células T NK nos pulmões, bem como sua citotoxicidade em material derivado de LBA (GOODBURN; DIDCOCK; RANDALL, 2000).

Resultados semelhantes foram encontrados por Dou et al. (2015) ao investigarem a dinâmica das células T NK em respostas vacinais contra estirpes homólogas e heterólogas do vírus da influenza em humanos. Notaram que a vacina induziu potencial resposta de memória por células T NK com o aumento de $IFN\gamma$ específica para o antígeno durante seis meses.

As células T NK são consideradas como fonte principal de $IFN\gamma$ até que linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ comecem a chegar no local da infecção após cinco a seis dias (HUSSELL; OPENSHAW, 1998). Como a produção de $IFN\gamma$ pelas células T NK depende da indução viral na síntese de IL-12 por macrófagos ou monócitos (BIRON et al., 1999), pode-se inferir que o aumento na população de monócitos sanguíneos $CD14^+$ no GA fez com que aumentasse a produção de IL-12 após a vacinação, aumentando a porcentagem de células T NK sanguíneas no GA. Por outro lado no LBA, como foi constatado declínio de macrófagos na citologia e na porcentagem de macrófagos alveolares vacuolizados $CD14^+$ dos animais do GA, bem como na porcentagem de macrófagos alveolares monócitos-*like* no GB, não foi observada mudança na população de células duplo-negativas no LBA dos grupos GA e GB.

No LBA, a presença de macrófagos polarizados $M\phi_{2c}$, ou macrófagos regulatórios, estimulados por IL-10 resulta em inibição na produção de citocinas pro-inflamatórias, como $TNF\alpha$, IL-6 e IL-12, além de inibir a apresentação de antígenos por monócitos e macrófagos via diminuição de regulação MHC II (MARTINEZ et al., 2008).

A função principal das moléculas de MHC II é apresentar antígenos processados, que são principalmente derivados de fontes exógenas, aos linfócitos T $CD4^+$ (HOLLING; SCHOOTEN; VAN DEN ELSEN, 2004). Caso haja um desencadeamento de fatores que levam à diminuição de regulação de moléculas MHC II, não haverá apresentação de antígenos aos linfócitos T $CD4^+$, assim sem essa sinalização a população dessas células não irá aumentar, como foi observado no LBA dos animais dos grupos GA e GB.

Portanto, sugere-se que no sangue dos animais do GA, a indução viral por vacina provocou aumento da porcentagem de monócitos, resultando em maior síntese de IL-12 por essas células. Isto estimulou a produção de IFN γ pelas células T NK, resultando em resposta viral específica. Por outro lado, no LBA, propõe-se que a vacina causou a diminuição de macrófagos CD14⁺ e polarização de macrófagos nos grupos GA e GB, os quais estimulados por IL-10 inibiram a apresentação de antígenos vacinais por moléculas MHC II a linfócitos T CD4⁺, o que resultou na diminuição também desta população.

Ao surgirem questionamentos em relação ao efeito do adjuvante na resposta vacinal, foi esclarecido que a utilização de adjuvantes saponinas do tipo ISCOM também induzem a produção de citocina IL-12 em ratos (SMITH et al., 1999) e resposta intensa de IFN γ (EMERY; ROTH; WOOD, 1990) além do isotipo IgG2a, polarizando uma resposta Th1 (KENSIL, 1996).

Como o adjuvante contido na vacina⁴⁵ utilizada nesse estudo contém a fração purificada QS21 do composto Quil-A, a resposta encontrada no sangue dos animais do GA também pode ser associada ao efeito do adjuvante.

O composto Quil-A é proveniente da árvore *Quillaia saponaria* que ligada a colesterol e fosfolípídeo formam o ISCOM. Foi descrito pela primeira vez há 20 anos como um sistema de apresentação de antígeno de potente ação imunoestimulante. Resultados de vacinas baseadas em ISCOM mostraram promover respostas tanto via anticorpos como celulares numa variedade de modelos animais experimentais (SPICKLER; ROTH, 2003; SANDERS et al., 2005).

Concordando com a resposta celular encontrada no sangue dos animais do GA, a indução no início da imunidade ativa é possível por meio da seleção do adjuvante e da via apropriada, inclusive de mucosa. Como os ISCOM são estruturas de superfície pequena (30-100 nm), as vacinas que contém este adjuvante têm mostrado estimular respostas imunes tanto humoral como mediada por células e são citadas por contornar a interferência negativa de anticorpos maternos passivamente adquiridos (NORDENGRÄHN et al., 1996; HÄGGLUND et al., 2004).

Em modelo murino, foi realizado um estudo comparativo para avaliar imunidade celular e humoral de resposta de mucosa, via intranasal, e parenteral, via subcutânea, utilizando a saponina QS-21 como adjuvante de uma vacina de DNA contra HIV. Os resultados foram positivos para as duas vias, evidenciando que o adjuvante QS21 pode ser utilizado em imunizações intranasais. Além disso, a resposta à vacinação intranasal foi

⁴⁵ PreZent-A®

caracterizada por alta produção de IgA, atividade citológica de células de linfonodos mesentéricos e altos níveis de IL-2 e IFN γ (SASAKI et al., 1998), concordando com a suposta conclusão em relação à resposta no animais do GA.

A via de mucosa utilizada com a vacina no estudo é uma meta relevante em neonatos, em particular a via intranasal tem a vantagem logística pela facilidade de aplicação e perspectivas imunológicas por se tornarem alvo de tecidos linfoides, no caso o NALT (TANAKA et al., 2007; KAVANAGH et al., 2013; LAMICHHANE; AZEGAMIA; KIYONOA, 2014). A dificuldade acrescida em bezerros desta idade é o potencial de interferência na resposta imune ativa de anticorpos maternos passivos (WOOLUMS et al., 2004; ELLIS et al., 2007).

O papel predominante de células B na eficácia das vacinas não deve sombrear a importância de respostas de células T por serem essenciais na indução de anticorpos de elevada afinidade e memória imunológica, ainda que alvos de vacinas tenham sido identificados contra os quais as células T são as principais efectoras (SIEGRIST, 2008).

Apesar dos linfócitos TCD3⁺ terem aumentado no sangue dos animais do GA, as células TCD4⁺ e TCD8⁺, que representam o braço da imunidade celular adaptativa desencadeada durante a infecção ou vacinação, não se alteraram ao longo do estudo. Semelhante às células B, as células T de memória não apenas bloqueiam diretamente a infecção, mas podem reduzir ou eliminar a replicação viral após a infecção ter ocorrido. No caso de vírus desencadeadores de doença sistêmica ou infecção do trato respiratório inferior (por exemplo, o CDRB), a imunidade protetora é tipicamente atribuída à pré-existente (AMANNA; SLIFKA, 2011), o que neste caso é a imunidade passiva associada à inata e adaptativa.

A resposta imune mediada por células é importante para a neutralização do vírus em diferentes espécimes (HALL et al., 1991; TAYLOR et al., 1995) como já demonstrado em estudos onde o esgotamento de linfócitos TCD8⁺ em ratos (GRAHAM et al., 1991) e em bovinos (THOMAS et al., 1996) resultou numa prolongada replicação do vírus nos pulmões. As células T CD4⁺ também têm sido relacionadas com a resposta imune a infecção pelo VSRB, pois como seus epítomos estão localizados na proteína F isso a torna capaz de reconhecer a proteína F viral induzindo uma resposta Th2, ou seja, com produção de citocinas como IFN γ e interleucinas (ROMÁN et al., 1997).

No entanto, partindo-se do pressuposto que macrófagos infectados pelo VDVB têm a função diminuída na apresentação de antígenos, e a resposta celular mediada por linfócitos T é importante para a resolução da infecção viral (KELLING, 2004), pode-se afirmar que por

via intranasal, a vacina não causou efeito na resposta mediada por linfócitos T CD4 e CD8, em ambos os grupos vacinados.

Diante disso, deve ser levado em consideração que durante os primeiros meses de vida subpopulações de linfócitos no sangue e provenientes de LBA são profundamente modificadas (SCHELCHER, 1997), e a resposta de linfócitos T parece ser reduzida durante as primeiras duas a cinco semanas de vida (FOSSUM; LARSSON; MATSSON, 1986; NAGAHATA et al., 1991).

Outro fator é que como as coletas foram realizadas após 21 dias da vacinação, pode ser que o pico de resposta vacinal já tivesse sido alcançado, o que impossibilitou a detecção de porcentagens maiores dessas células, visto que os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ chegam no local da infecção após cinco a seis dias (HUSSELL; OPENSHAW, 1998).

Dessa maneira, a ausência dessa resposta nos animais vacinados é desfavorável, uma vez que as populações de LT tem demonstrado ter papel crítico na resposta imune à vacinação, como demonstrado por Platt et al. (2009). Diferente do encontrado no presente estudo, Platt et al. (2009), concluíram que vacinas virais atenuadas contendo VDVB-1 (estirpe Singer), VDVB-2 (estirpe Bolin 296), HVB-1 (estirpe Colorado), VSRB (estirpe proprietária) e PI-3 (estirpe proprietária) com adjuvante proprietário⁴⁶ por via subcutânea induziram resposta principalmente celular mediada por LT quando administradas nas primeiras semanas de vida de bezerros e após desafio. Porém, como a via utilizada por esses autores foi diferente à utilizada no presente estudo, pode-se implicar essa resposta à via parenteral.

Da mesma forma, pela via intramuscular, evidências de que a vacina induz a resposta por linfócitos em neonatos foram consistentes em estudo realizado por West et al. (2000) ao vacinarem bezerros de uma a quatro semanas de idade com duas de vacina polivalente contendo VSRB vivo modificado e verificarem o aumento da proliferação de linfócitos e da produção de IFN γ .

De fato, como observado no presente estudo, a administração de antígenos ao aparelho respiratório humano podem induzir redução da proliferação de subpopulações de células T e aumento da secreção de citocinas imunossupressoras como a IL-10, sem alterar a imunidade humoral (CHEN; CERUTTI, 2010).

A supressão da resposta de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ observada nos animais vacinados, pode ainda ser compensada pela indução de IgA local, como observado por Ellis et al. (2007) ao utilizarem a via intranasal para avaliar a resposta à vacina polivalente⁴⁷

⁴⁶ Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO

⁴⁷ Bovishield4, Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Mich.

formulada para uso parenteral, semelhante à utilizada no presente estudo. Estes autores compararam a resposta de bezerros de duas a nove semanas de idade ao desafio viral após a vacinação e obtiveram resultados de forte resposta humoral, por meio da presença de IgA específica em secreções nasais.

No LBA, não foi possível a obtenção de quantidade suficiente de células $CD3^+$ para a imunofenotipagem, tornando incoerente a análise da marcação realizada de moléculas CD4 e CD8 uma vez que essas populações estariam inseridas no *gate* de células CD3, como foi realizado no sangue. Contudo, populações de células $CD3^+$ foram encontradas no BALT de bezerros de quatro a seis semanas de idade vacinados por via intranasal com VSRB isolado de baixa virulência, indicando a relação com a resposta local (WOOLUMS et al., 2004).

Assim como foi encontrado nos animais do GA, a análise de células recuperadas de LBA de bezerros oito dias após a infecção mostraram que não houve aumento significativo de linfócitos, cuja contagem não ultrapassou 5% de todas as células, ao invés disso apresentaram um influxo de neutrófilos (TAYLOR; THOMAS; STOTT, 1989).

Por outro lado, foi observado aumento na porcentagem de células sanguíneas $TCD3^+CD4^+CD8^+$, duplo-positivas, no GA, as quais tem sido correlacionadas com respostas citotóxicas durante infecções virais. Em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), foi mostrado que as células duplo-positivas são efetoras altamente proliferativas e ativas (KITCHEN et al., 2004; NASCIMBENI et al., 2004; FRAHM et al., 2012).

O desenvolvimento de células T é um processo ordenado para acontecer exclusivamente no timo, onde as células duplo-positivas se desenvolvem em células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ com expressão mutuamente excludente destes dois receptores (OVERGAARD et al., 2015). Apesar disso, células duplo-positivas são eventualmente encontradas na corrente sanguínea e isto pode ser explicado como uma liberação prematura destas células pelo timo (JIMÉNEZ et al., 2002).

No entanto, como observado nos animais do GA após a vacinação, o aumento da expressão de células duplo-positivas no sangue, tem sido observado após a vacinação bem como em infecções virais agudas, crônicas ou persistentes, como pelo HIV ou pelo vírus de Epstein-Barr em humanos (ORTOLANI et al., 1993; WEISS et al., 1998; NASCIMBENI et al., 2004).

De forma semelhante, Baba et al. (2012) encontraram população duplo-positiva de monócitos no sangue periférico e em lesões cardíacas de ratos transgênicos contendo o vírus da leucemia humana. O número de monócitos duplo-positivos e sua função citotóxica

aumentaram após imunização com cepa de *Mycobacterium* com adjuvante miosina⁴⁸ ou após administração de adjuvantes unicamente.

No LBA, a porcentagem de células duplo-positivas caiu nos animais do GB, demonstrando mais uma vez a diferença entre as respostas sistêmica e local. Discordando desse resultado, foi evidenciado que linfócitos podem ser encontrados nos pulmões, no fígado e no intestino e que a inflamação pulmonar induzida por *Mycobacterium sp* foi associada com um aparecimento de células T extratímicas nos pulmões de murino (TABATA et al., 1996).

Penttilä et al. (1998), de modo divergente, detectaram a expansão da população de TCD3⁻CD4⁺CD8⁺ nos pulmões de camundongos infectados intranasalmente tanto com *Chlamydia pneumoniae* como com o vírus da influenza A. O seu acúmulo no local infectado pode ter efeitos na reconstituição do epitélio pulmonar em decorrência dos efeitos destrutivos nas células infectadas. Apesar de que nas análises do presente estudo não foi possível a avaliação da expressão de CD3 no LBA, não se exclui a possibilidade da população de células duplo-positivas ser CD3⁻. Sendo assim, a diminuição na porcentagem de células duplo-positivas no LBA dos animais do GB demonstraria resposta desfavorável ao animal.

Diante do exposto, a hipótese de que exista influência da idade dos bezerros na resposta vacinal e que a resposta local é diferente da sistêmica foram reforçadas. Os animais do GA apresentaram resposta sanguínea celular mais intensa que o GB, com aumento de monócitos CD14⁺ e linfócitos duplo positivos e duplo negativos, o que sugeriu a relação dessas populações com mecanismos de defesa imunes que são favoráveis à resposta vacinal protetora. A população de células duplo positivas foi relacionada com imaturidade do sistema imune, mas também com resposta à vírus. O grupo GB, não apresentou alterações nessas populações sanguíneas, indicando baixa resposta celular. Os dois grupos, no entanto, não apresentaram alteração nas populações de linfócitos sanguíneos e locais TCD4⁺ e TCD8⁺, o que indicou resposta desfavorável, dado a importância estabelecida dessas populações na resposta vacinal. Nos dois grupos também ocorreu a diminuição da população de macrófagos alveolares, possivelmente relacionada à inibição da resposta pela polarização de macrófagos. Ainda no LBA, a população de células duplo positivas foi relacionada com resposta vacinal e à vírus, porém como não foi alterada nos animais do GA e diminuiu nos animais do GB, foi considerada negativa à resposta vacinal.

⁴⁸ Freund incomplete adjuvante (Sigma-Aldrich)

6.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS FAGÓCITOS SANGUÍNEOS E PULMONARES

A resposta imunológica de um animal à vacinação é similar a sua resposta à doenças e envolve ambos os aspectos específicos e não específicos do sistema imune. Apesar da similaridade, as vacinas são consideradas intervenções seguras para o animal sem causar importantes danos a sua saúde, no entanto o desenvolvimento da doença contra qual o animal foi vacinado é uma potencial complicação da vacinação, particularmente em animais imunossuprimidos (DHEIN; GORHAM, 1986; RIDPATH; BOLIN, 1995).

Esse fato pode explicar, ao menos em parte, a redução das funções de monócitos sanguíneos, macrófagos alveolares vacuolizados e monócitos-*like* e neutrófilos sanguíneos e pulmonares.

No intuito de mimetizar uma infecção natural, foi realizado o desafio *ex vivo* com bactérias representantes dos principais grupos de patógenos associados ao quadro respiratório em bezerros (GRIFFIN et al., 2010; BENESI et al., 2012), o *Staphylococcus aureus*, representante das Gram+ e a *Escherichia coli*, representante do grupo de bactérias Gram- (GRIFFIN et al., 2010). Por motivos de disponibilidade e padronização prévia da técnica, a bactéria *E. coli* foi escolhida, porém o ideal seria utilizar uma cepa de *M. haemolytica*, por sua alta incidência na patogênese de pneumonia em bezerros. Ensaio para confirmar a conjugação da *M. haemolytica* a *R-Phycoerythrin* foram realizados com sucesso por citometria de fluxo no estudo de Batista (2015), no entanto a padronização da técnica ainda não estava finalizada antes do presente estudo.

O papel crucial dos macrófagos alveolares pulmonares residentes e neutrófilos contra infecções bacterianas, juntamente com a lenta maturação do sistema imunológico em recém-nascidos (CORTESE, 2009; BATISTA et al., 2012) e os fatores anatômicos e fisiológicos do trato respiratório de bovinos, permitem que agentes patogênicos permaneçam nas vias aéreas e contribuem para a susceptibilidade à pneumonia (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010; BATISTA et al., 2012), em conjunto podem promover o risco ou o aumento de susceptibilidade a infecções bacterianas oportunistas, como a *M. haemolytica*, após a vacinação polivalente devido às múltiplas interações entre os diversos agentes infecciosos. Um habitante comensal da nasofaringe, a *M. haemolytica* atua como um oportunista quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas (GRIFFIN, 2010).

O perfil multipopulacional de macrófagos ocupa uma posição de destaque na proteção contra patógenos, uma vez que são o tipo de célula predominante nas vias respiratórias, e responsáveis pela fagocitose e morte intracelular de patógenos (BATISTA et al., 2012).

Em conjunto, esses dados indicam que principalmente macrófagos pulmonares alveolares vacuolizados de animais vacinados (GA e GB) tiveram suas funções prejudicadas quando comparados com os seus controles não vacinados.

Equivalente aos presentes resultados, alguns estudos têm demonstrado funções prejudicadas de macrófagos durante a infecção natural por doenças virais pelo vírus vivo atenuado e modificado que compõem a vacina polivalente usada aqui. Por exemplo, foi descrita uma redução significativa na capacidade de atividade bactericida dos macrófagos alveolares pulmonares em bezerros inoculados experimentalmente com o VDVb (WELSH; ADAIR; FOSTER, 1995). Apesar do fato de que os mecanismos de resposta a vacinas serem semelhantes aos utilizados pela presença do agente patogênico (DHEIN; GORHAM, 1986), o uso de uma vacina polivalente pode desencadear uma resposta diferente de uma única infecção viral. Assim como, existe a possibilidade de exposição concomitante aos vírus no ambiente.

Mesmo assim, em um estudo sobre o efeito do VSRB e VDVb não-citopático (VDVB-ncp) (LIU; LEHMKUHL; KAEBERLE, 1999), foi verificado que as infecções virais, tanto individuais e combinadas diminuíram significativamente a expressão do receptor pulmonar alveolar de macrófagos Fc (um importante indicador de função dos macrófagos alveolares pulmonares, pois reflete a capacidade fagocitária destas células), a fusão fagossoma-lisossoma, e secreção de fatores quimiotáticos com depressão sinérgica mais significativa na co-infecção VSRB e VDVb-ncp. A diminuição na produção de O_2^- pelos macrófagos alveolares durante a co-infecção com VSRB e VDVb-ncp também foi encontrada. Além disso, em outro estudo, verificou-se diminuição da atividade mediada pelo receptor Fc e na fagocitose por macrófagos alveolares, devido à infecção por HVB (FORMANT; BABIUKL, 1982).

Outra explicação para os presentes resultados podem ser ligados à polarização de macrófagos. Uma característica que parece ser partilhada pela maioria dos macrófagos reguladores é a necessidade de dois estímulos para induzir a atividade anti-inflamatória. O primeiro sinal (isto é, complexos imunes) geralmente tem pouca ou nenhuma função estimuladora, no entanto, quando combinado com um segundo estímulo, tais como ligantes de TLR (MOSSER; EDWARDS, 2008), como aqueles presentes em adjuvantes (COFFMAN; SHER; SEDER, 2010), os dois sinais reprogramam os macrófagos para produzir IL-10,

produção importante e característica de macrófagos reguladores. Uma vez que a IL-10 pode inibir a produção e a atividade de várias citocinas pró-inflamatórias, estes macrófagos reguladores são potentes inibidores da inflamação, apesar do fato de que os mesmos mantêm a capacidade de produzir muitas citocinas pró-inflamatórias (MOSSER; EDWARDS, 2008), as quais são pouco microbicidas. Isto indica que a presença de macrófagos reguladores poderia estar negativamente correlacionada com a resposta à vacina, o que requer a indução de citocinas pró-inflamatórias. Com isto em mente, mais estudos caracterizando o ajuste da polarização de macrófagos induzida por vacinação pode ser útil.

Com comportamento semelhante aos macrófagos vacuolizados, uma disfunção em neutrófilos sanguíneos e alveolares foi observado nos animais vacinados. Os resultados reforçam a ideia de que os animais vacinados, especialmente aos 15 dias de idade, provavelmente devido a maturação do próprio sistema imunológico do bezerro e/ou à presença de anticorpos maternos, estão sob maior susceptibilidade a infecções bacterianas do que bezerros não vacinados, considerando a importância crucial de neutrófilos e macrófagos contra infecções bacterianas.

De acordo com os presentes resultados, Hauser et al. (1986) observaram que a vacina com estirpe de VDVB vivo modificado foi capaz de suprimir a função de linfócitos e neutrófilos (a atividade do sistema antibacteriano da mieloperoxidase- H_2O_2 haleto e a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos) de maneira semelhante ao VDVB virulento. Neste contexto, em um estudo de campo, Martin et al. (1980) observaram associação positiva entre o uso de vacinas (como utilizadas no campo) e mortalidade (ou seja, por pneumonia fibrinosa e broncopneumonia), com a maior taxa de mortalidade nos grupos que receberam a vacina combinada com HVB, PI-3 e VDVB. Congruentemente, em outro estudo utilizando vacinas polivalentes em cães contra, entre outras doenças, tosse do canil e leptospirose, foi observada diminuição na resposta mitogênica de células T e, na função dos neutrófilos acompanhado de aumento simultâneo na IgG de plasma e atividade do complemento hemolítico, sugerindo uma mudança transitória no equilíbrio da imunidade mediada por células e humoral (Th1/Th2) em vez de imunossupressão (STRASSER et al., 2003).

Nesta idade, a resposta principal em bezerros é a Th2, humoral, no entanto, a maior parte da proteção imune nos bezerros parece ser conferida pela resposta celular ou Th1, a qual se apresentou predominante em animais com mais de dois meses (GRELL et al., 2005; PLATT et al., 2009), e para que a resposta seja eficaz, as células necessitam estar com suas funções normais ou habilitadas.

Foi relatada em bezerros redução na atividade bactericida de neutrófilos sanguíneos após a exposição com o PI-3 e diminuição da migração aleatória de neutrófilos após a infecção com o HVB (BRIGGS; KEHRLI; FRANK, 1988), e também foi descrito que os sistemas antibacterianos mieloperoxidase, peróxido de hidrogênio e haleto são prejudicados em bovinos infectados com VDVB (ROTH; KAEBERLE; GRIFFITH, 1981). Assim, o uso da vacina em questão, polivalente viva atenuada e modificada, pode simular a infecção natural e predispor o animal a infecções bacterianas secundárias.

Em face dos resultados, o estudo mostrou que bezerros vacinados pela via intranasal, especialmente aos 15 dias de idade, podem ter algumas funções de macrófagos/monócitos e neutrófilos prejudicadas, que por sua vez, podem predispor os animais a infecções bacterianas. Mas, é preciso deixar claro que esses resultados foram encontrados usando esta via, com esses patógenos e nessa idade. Portanto, não é possível generalizar os resultados para outras vacinas, vias ou idades. Assim, embora a vacinação apareça como abordagem promissora e muito necessária para prevenir doenças infecciosas, especialmente para doenças virais imunossupressoras, também podem aumentar a susceptibilidade a outras infecções oportunistas. O seu uso deve ser preconizado em fazendas sob maior incidência a estas infecções virais. Ainda mais importante é a intensificação de perigos ocasionais associados à utilização de vacinas de vírus vivos ou atenuados modificados na presença de outro agente infeccioso. Presumivelmente, a interação entre um grande número de agentes infecciosos e vacina viva modificada ou atenuada pode existir.

6.6 PESQUISA DE ANTICORPOS

A partir da análise dos resultados da pesquisa de anticorpos séricos neutralizantes pela virusneutralização e da pesquisa de anticorpos específicos por ELISA, foi concluído que a presença de anticorpos séricos nos animais do GA foram provenientes da transferência de imunidade passiva. O nível de anticorpos para todos os vírus foram maiores no M1 e diminuíram gradativamente até o M3 nesse grupo diferindo do CTLA em todos os momentos. Esse resultado pode ter sido ocasionado pelo fato de que como os animais provieram de fazendas distintas, apesar de todos terem mamado o colostro, existe uma diferença na quantidade de anticorpos transferidos passivamente que variou entre as propriedades. Apesar

disso, conclui-se também que a presença de anticorpos colostrais não interferiu na resposta à vacina, uma vez que o nível de anticorpos dos animais do GB não diferiu do CTLB.

Os resultados concordaram com o trabalho de Silva (2015) que pela via parenteral, mostrou que a resposta à vacina polivalente não sofreu interferência dos anticorpos maternos para nenhum dos vírus. Além disso, assim como, Silva (2015), a vacina não induziu a soroconversão de anticorpos neutralizantes a nenhum dos antígenos vacinais.

Por outro lado, Mawhinney e Burrows (2005) ao compararem a resposta humoral de dois grupos vacinados uma única vez por via parenteral um com vacina monovalente de VSRB vivo modificado e outra com vacina combinada inativada de VSRB, PI-3 e *M. haemolytica* obtiveram níveis maiores de IgG sérica específica para o VSRB do que os animais não vacinados, principalmente com os vírus inativado.

Corroborando com os resultados da presente pesquisa, Ellis et al. (2007) não obtiveram boa resposta humoral de IgG específica para o VSRB ao vacinarem e desafiarem intranasalmente bezerros de nove semanas de idade contra o vírus, no entanto a resposta de mucosa com IgA específica foi alta. Grell et al. (2005) também encontraram aumento de anticorpos IgA específicos para o VRSB, porém no sangue e após infecção experimental. Também concluíram que animais mais velhos, acima de 32 semanas, tem melhor resposta humoral ao vírus do que os mais novos entre uma a 16 semanas de vida. Porém, o fato dos anticorpos colostrais em animais do GA se apresentarem com maior título do que os do GB, inviabiliza a comparação entre as idades nesse aspecto.

Muitos estudos identificaram que existe grande contribuição local de IgA à defesa imune do trato respiratório contra uma variedade de agentes potencialmente patogênicos associada a papel específico de tecidos linfoides associados à mucosa, como o NALT (DHEIN; GORHAM, 1986; HERITAGE et al., 1997, 1998; ANDOH et al., 2002; HISHIKI et al., 2004).

A capacidade de montar resposta de IgA de mucosa em animais imunizados por via mucosa tem sido correlacionada com virusneutralização reduzida. Isto sugere que mecanismos mediados por células da mucosa não identificados foram envolvidos na proteção (KIMMAN; WESTENBRINK; STRAVER, 1989; HALL et al., 1991).

Woolums et al. (2013) dosaram as concentrações de IgA total e específica para HVB-1 em secreções nasais de dois grupos de bezerros vacinados intranasalmente com vacina polivalente viva modificada⁴⁹ contendo HVB-1, VDVB-1, VDVB-2, VSRB, PI-3 e cepa atenuada de *M. haemolytica* e *P. multocida*, um grupo aos dois dias de idade e outro aos 70

⁴⁹ Onset 5 IN, Intervet-Schering/Plough, Summit, NJ.

dias e os resultados foram comparados com a resposta de animais vacinados por via subcutânea. As concentrações aumentaram durante todo o período observado em todos grupos, inclusive nos vacinados via subcutânea, no entanto os autores relataram a possibilidade de exposição natural ao vírus. Apesar disso, foi possível verificar semelhança com os resultados do GA uma vez que a concentração de IgA neste grupo aumentou continuamente no LBA até o M3. Existe a possibilidade do GB não ter apresentado aumento significativo na concentração de IgA como apresentaram os animais com 70 dias de idade de Woolums et al. (2013) pelo fato destes autores terem utilizado secreção nasal, cuja concentração de IgA é maior do que no LBA (MACH; PAHUD, 1971). Isto pode ser sugerido pelo fato da diluição necessária ter sido diferente, quando foi utilizado uma diluição de 1 : 50.000 para Woolums et al. (2013) e 1:2.000 no estudo em questão.

O nível de IgA sérico, no entanto é contrário ao observado aqui, como descrito por Grell et al (2005) ao pesquisarem a resposta de anticorpos séricos após infecção experimental com inóculo de VSRB (estirpe 2022) por inalação e injeção intratraqueal em bezerros de diferentes idades, um grupo com animais entre um a cinco semanas de idade, outro com seis a 16 semanas e outro com 32 a 37 semanas. Foram encontradas grandes diferenças entre as concentrações de IgA sérico específico entre os grupos, sendo o grupo mais velho o único responsivo. Este fato reforça a hipótese que animais mais jovens possuem baixa resposta humoral sérica, no entanto a resposta local de IgA é presente mesmo em animais sadios (BERTAGNON et al., 2007) e sem o estímulo vacinal como foi observado nos animais controle (CTLA e CTLB), contradizendo Anderson et al. (1986) que afirma que bezerros neonatais não possuem IgA no pulmão.

Os resultados de pesquisa de anticorpos bacterianos para os sorotipos de *Leptospira* foram em sua grande maioria negativos em todos os animais. A disfunção renal, hepática, a miocardite e hemorragia pulmonar são as principais manifestações clínicas observadas em consequência à vasculite causada por injúria direta a células do endotélio capilar. Apesar de se tratar de uma bactéria do âmbito de doenças reprodutivas, existe a possibilidade da bactéria causar pneumonia. A injúria pulmonar durante os processos inflamatórios tem sido associada ao excesso de células estimuladas no pulmão, incluindo os macrófagos alveolares, polimorfonucleares e produção de ERO (NALLY et al., 2004; MARINHO, 2012). Como as funções celulares, em grande parte, diminuíram e não houve influxo de macrófagos alveolares, pelo contrário, essa população diminuiu nos animais do GA, concluiu-se que as cepas de *Leptospira* contidas na vacina não influenciaram a resposta observada nos animais vacinados.

7 CONCLUSÕES

A análise em conjunto dos resultados desse estudo permitiu a conclusão que a resposta à vacina utilizada por via intranasal sofreu influência etária, sendo a faixa etária do GA a que mais sofreu alterações.

- A partir de avaliações dos resultados de exame clínico, leucograma e citologia do LBA, foi entendido que a resposta à vacina foi mais influente nos animais do GA do que nos do GB, uma vez que alterou todos esses parâmetros. O aumento de neutrófilos locais e sistêmicos nos animais do GA apesar de ter sido associado à imaturidade imunológica mais intensa, o papel dos neutrófilos na integração dos sistemas imunes inato e adaptativo foi evidenciado, devendo-se dar mais importância à sua presença em protocolos vacinais e ao que ela representa.
- Os animais do GA apresentaram resposta sanguínea celular mais intensa que o GB, com aumento de monócitos $CD14^+$ e linfócitos duplo positivos e duplo negativos, o que evidencia a relação dessas populações com mecanismos de defesa imunes que são favoráveis à resposta vacinal protetora. O grupo GB, não apresentou alterações nessas populações sanguíneas, indicando baixa resposta celular sanguínea.
- Nenhum dos grupos vacinados apresentou alteração nas populações de linfócitos sanguíneos e locais $TCD4^+$ e $TCD8^+$, o que indicou baixa resposta para esse tipo celular, dado a importância estabelecida dessas populações na resposta vacinal.
- O estudo mostrou que bezerros vacinados pela via intranasal, especialmente aos 15 dias de idade, podem ter funções de macrófagos/monócitos e neutrófilos prejudicadas, que por sua vez, podem predispor os animais a infecções bacterianas. A diminuição funcional da população de macrófagos alveolares foi relacionada à inibição da resposta pela polarização de macrófagos pós vacinal.
- Não foi evidenciada resposta humoral à vacina intranasal por meio de anticorpos séricos em nenhum dos grupos tampouco a interferência de anticorpos maternos. No entanto, houve aumento da resposta local de IgA mais intensa nos animais do GA.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABELLA-BOURGES, N. **Immunophenotypage et cytométrie en flux des sous - populations lymphocytaires du sang et du liquide de lavage broncho-alveolaire chez le bovin**. 1994. Institut National Polytechnique Toulouse, 1994.
- ACKERMANN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. Innate immunology of bovine respiratory disease. **The Veterinary Clinics of North America**. Food Animal Practice, v. 26, n. 2, p. 215–28, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2904317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- ALLEN, J. W.; VIEL, L.; BATEMAN, K. G.; ROSENDAL, S.; SHEWEN, P. E. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 56, n. 2, p. 122–6, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1263519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 206–15, 15 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210007701>>. Acesso em: 31 jan. 2016.
- AMES, T. R.; BAKER, J. C.; WIKSE, S. E. As broncopneumonias (complexo de doenças respiratórias de bovinos, ovinos e caprinos). In: SMITH, B. P. (Ed.). **Medicina interna de grandes animais**. 3^a. ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 511–570.
- ANDERSON, M. L.; MOORE, P. F.; HYDE, D. M.; DUNGWORTH, D. L. Immunoglobulin containing cells in the tracheobronchial tree of cattle: relationship to age. **Research in Veterinary Science**, v. 41, n. 2, p. 221–7, set. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3534984>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- ANDOH, A.; MASUDA, A.; KUMAZAWA, Y.; KASAJIMA, T. Serum antibody response and nasal lymphoid tissue (NALT) structure in the absence of IL-4 or IFN-gamma. **Cytokine**, v. 20, n. 3, p. 107–12, 7 nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453468>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- ANTONIS, A. F. G.; DE JONG, M. C.; VAN DER POEL, W. H. M.; VAN DER MOST, R. G.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; KIMMAN, T.; SCHRIJVER, R. S. Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 10, p. 2497–506, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554798>>. Acesso em: 1 fev. 2016.
- ASSIÉ, S.; SEEGER, H.; BEAUDEAU, F. Incidence of respiratory disorders during housing in non-weaned Charolais calves in cow-calf farms of Pays de la Loire (Western France). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 3-4, p. 271–82, 14 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158575>>. Acesso em: 24 fev. 2016.

- BABA, T.; ISHIZU, A.; IWASAKI, S.; SUZUKI, A.; TOMARU, U.; IKEDA, H.; DC, W.; YOSHIKI, T.; KASAHARA, M. CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype. **Technology**, v. 107, n. 5, p. 2004–2012, 2012.
- BABIUK, L. A.; LAWMAN, M. J.; OHMANN, H. B. Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. **Advances in Virus Research**, v. 35, p. 219–49, jan. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3148270>>. Acesso em: 24 fev. 2016.
- BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 31–42, nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010996>>. Acesso em: 14 mar. 2016.
- BACCILI, C. C.; MARQUES, R. S.; NOVO, S. M. F.; SILVA, B. T.; PITUCO, E. M.; GOMES, V. Immune response in holstein calves vaccinated at six months of age. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1310, p. 1–7, 2015.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425–45, nov. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581856>>. Acesso em: 21 jan. 2016.
- BARRIOS, C.; BRANDT, C.; BERNEY, M.; LAMBERT, P. H.; SIEGRIST, C. A. Partial correction of the TH2/TH1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 11, p. 2666–70, nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8921953>>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- BARROS, M. S. R. M.; CASTRO, R. S.; TABOSA, J. H. C.; BRITO, M. F.; AMARAL, B. Colheita do fluido brônquico-alveolar de bezerros através da traqueocênese transcutânea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p. 41–49, 1994.
- BARTON, G. M. Viral recognition by Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 33–40, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336545>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- BASTO, A. P.; LEITÃO, A. Targeting TLR2 for vaccine development. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 619410, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4098989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- BATISTA, C. F. **Dinâmica de fagócitos sanguíneos e alveolares em bezerros com manheimiose**. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2015.
- BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M. G.; BERTAGNON, H. G.; GOMES, R. C.; SANTOS, K. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Evolution of phagocytic function in monocytes and neutrophils blood cells of healthy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8882–8, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476941>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M. G.; SANTOS, B. P.; BERTAGNON, H. G.; PARRA, a C.; VIANNA, R. S.; DE LUCCA, G. G.; LIMA, D. M.; SANTOS, D. S.; DELLA LIBERA, a M.

- M. P. Maturation of mononuclear phagocytes in the lungs of young calves--in vitro study. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5909–15, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22901490>>. Acesso em: 3 ago. 2014.
- BENESI, F. J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros. Importância e avaliação crítica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 16, p. 38–48, 1993.
- BENESI, F. J.; BERTAGNON, H. G.; WACHHOLZ, L.; LEAL, M. L. R.; FERNANDES, W. R.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Microbiota bacteriana e citologia da região traqueobrônquica de bezerros no período neonatal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 700–704, jun. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000600002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 ago. 2014.
- BENESI, F. J.; WACHHOLZ, L.; BERTAGNON, H. G.; LEAL, M. L. R.; MORI, E.; FERNANDES, W. R. Citologia dos lavados traqueobrônquico (LTB) e broncoalveolar (LBA) de bezerros holandeses sadios durante o primeiro mês de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 267–270, mar. 2012.
- BERTAGNON, H. G. **Avaliação da resposta imune inata respiratória em bezerros sadios durante o segundo trimestre de vida**. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2015.
- BERTAGNON, H. G.; ESPER, G. V. Z.; EMANUELLI, M. P.; PELLEGRINE, G. De. Influência meteorológica no leucograma e na população citológica do trato respiratório de bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 244–246, 2011.
- BERTAGNON, H. G.; SILVA, P. E. G. da; WACHHOLZ, L.; LEAL, M. L. R.; FERNANDES, W. R.; BENESI, F. J. Immunoglobulin in the respiratory tract of healthy calves during their first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 487–490, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007001200003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- BIRGEL, E. H. Hematologia Clínica Veterinária. In: BIRGEL, E. H. .; BENESI, F. J. (Ed.). **Patologia Clínica Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2–49.
- BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P.; SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 189–220, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358757>>. Acesso em: 8 fev. 2016.
- BITTAR, C. M. M.; FERREIRA, L. S. **A que temperatura devemos descongelar colostro?** Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/animais-jovens/a-que-temperatura-devemos-descongelar-colostro-31184n.aspx>>. Acesso em: 24 mar. 2016.
- BLISS, S. K.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Murine neutrophil stimulation by Toxoplasma gondii antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. **Journal of Immunology** v. 163, n. 4, p. 2081–8, 15 ago. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438947>>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Specificity of Neutralizing and Precipitating Antibodies

Induced in Healthy Calves by Monovalent Modified-Live Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccines. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 6, p. 817–21, jun. 1989. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/2548419>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

BOWLAND, S. L.; SHEWEN, P. E. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. **The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne**, v. 41, n. 1, p. 33–48, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1476343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRADLEY, L. M. Migration and T-lymphocyte effector function. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 3, p. 343–8, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787762>>. Acesso em: 28 fev. 2016.

BRANDTZAEG, P.; KIYONO, H.; PABST, R.; RUSSELL, M. W. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 31–7, jan. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mi.2007.9>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

BRIGGS, R. E.; KEHRLI, M.; FRANK, G. H. Effects of infection with parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus on neutrophil functions in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 5, p. 682–6, maio 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840008>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

BURGOS, R. A.; CONEJEROS, I.; HIDALGO, M. A.; WERLING, D.; HERMOSILLA, C. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 1-2, p. 1–10, 15 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764141>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 1–45, v. mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682934>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

BURTON, J. L.; MADSEN, S. A.; CHANG, L.-C.; WEBER, P. S. D.; BUCKHAM, K. R.; VAN DORP, R.; HICKEY, M.-C.; EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, n. 3-4, p. 197–219, 15 maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15808301>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

CAI, T. Q.; WESTON, P. G.; LUND, L. A.; BRODIE, B.; MCKENNA, D. J.; WAGNER, W. C. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 7, p. 934–43, jul. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7526753>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

CASTELEYN, C. **Morphological characteristics of the ovine tonsils**: a study of their volume and surface area, lymphoid tissue organization, lining epithelia and vascular

- architecture. 2010. Thesis (PhD) - Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, 2010. Disponível em: <<https://biblio.ugent.be/publication/1169172>>. Acesso em: 1 mar. 2016.
- CASWELL, J. L. Failure of Respiratory Defenses in the Pathogenesis of Bacterial Pneumonia of Cattle. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 393–409, set. 2014.
- CHARLES, T. P.; CAMPOS, O. F.; LIZIERE, R. S. Uso do teste de coagulação pelo glutaraldeído como indicador no nível de imunoglobulinas no soro e sangue de bezerros recém nascidos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 221–227, 1994.
- CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87–104, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18299033>>. Acesso em: 25 fev. 2016.
- CHEN, K.; CERUTTI, A. Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 479–91, 29 out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3045856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 fev. 2016.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492–503, 29 out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3420356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 dez. 2015.
- CORTESE, V. S. Neonatal immunology. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 221–7, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174291>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- COSTA, M. C. da; FLAIBAN, K. K. M. da C.; CONEGLIAN, M. M.; DOGNANI, R.; VETTORATO, E. D.; BALARIN, M. R. S.; LISBÔA, J. A. N. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros das raças Nelore e Limousin nos primeiros quatro meses de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 431–436, set. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008000900007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JR., D.; ARAÚJO, J. A. P.; SALMAZI, K. C.; KÁLLAS, E. G.; ANDRADE, L. E. C. Células T regulatórias naturais (T Regs) em doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342–355, dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042008000600007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- CUSACK, P. M. V.; MCMENIMAN, N.; LEAN, I. J. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 8, p. 480–7, ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086084>>. Acesso em: 25 fev. 2016.
- DASHTSOODOL, N.; WATARAI, H.; SAKATA, S.; TANIGUCHI, M. Identification of CD4(-)CD8(-) double-negative natural killer T cell precursors in the thymus. **PloS One**, v. 3, n. 11, p. e3688, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2577011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ertype=abstract>. Acesso em: 15 mar. 2016.

DHEIN, C. R.; GORHAM, J. R. Host Response to Vaccination. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 16, n. 6, p. 1227–1245, nov. 1986. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019556168650139X>>. Acesso em: 8 fev. 2016.

DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STOBBER, M. **Rosenberger**: exame clínico dos bovinos. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

DONNELLY, S. C.; HASLETT, C. Cellular mechanisms of acute lung injury: implications for future treatment in the adult respiratory distress syndrome. **Thorax**, v. 47, n. 4, p. 260–3, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=463683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 fev. 2016.

DOU, Y.; FU, B.; SUN, R.; LI, W.; HU, W.; TIAN, Z.; WEI, H. Influenza vaccine induces intracellular immune memory of human NK cells. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0121258, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4363902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

DURHAM, P. J.; FORBES-FAULKNER, J. C. The prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis viruses in diagnostic sera from New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, n. 10, p. 226–9, out. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/174036>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

ELLIS, J. A.; GOW, S. P.; GOJI, N. Response to experimentally induced infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of seropositive and seronegative calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 9, p. 991–9, 1 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433400>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

ELLIS, J.; GOW, S.; WEST, K.; WALDNER, C.; RHODES, C.; MUTWIRI, G.; ROSENBERG, H. Response of calves to challenge exposure with virulent bovine respiratory syncytial virus following intranasal administration of vaccines formulated for parenteral administration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 2, p. 233–43, 15 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223757>>. Acesso em: 22 abr. 2014.

EMERY, D. L.; ROTHEN, J. S.; WOOD, P. R. Influence of antigens and adjuvants on the production of gamma-interferon and antibody by ovine lymphocytes. **Immunology and Cell Biology**, v. 68 (Pt 2), p. 127–36, abr. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116995>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

FADEN, H.; OGRA, P. Neutrophils and antiviral defense. **Pediatric Infectious Disease**, v. 5, n. 1, p. 86–92, jan. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3511457>>. Acesso em: 27 fev. 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization; WHO, World Health Organization. **Codex Alimentarius. Internacional food standards. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods**. 2015. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Codex Alimentarius](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Codex%20Alimentarius) -

CAC MRL 02-2015 - LMRS do Codex med veterin%C3%A1rios.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2016.

FASTIER, L. B.; HANSEN, N. F. The occurrence of antibodies to bovine virus diarrhoea, infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza 3 viruses in sera from New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 14, n. 3-4, p. 27–32, jan. 1966. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5221321>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

FORMANT, A. J.; BABIUK, L. A. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bovine alveolar macrophage function. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 3, p. 1041–1047, 1982.

FOSSUM, C.; LARSSON, B.; MATSSON, P. Development of Mononuclear Cell Subpopulations and their Function During Calfhood. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 33, n. 1-10, p. 518–527, 12 jan. 1986. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0450.1986.tb00063.x>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

FRAHM, M. A.; PICKING, R. A.; KURUC, J. D.; MCGEE, K. S.; GAY, C. L.; ERON, J. J.; HICKS, C. B.; TOMARAS, G. D.; FERRARI, G. CD4+CD8+ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4289–96, 1 maio 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3692005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

GERSHWIN, L. J. Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 253–7, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410266>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

GONÇALVES, R. C. **Estudo clínico e citológico em bezerros clinicamente saudáveis e portadores de broncopneumonia moderada e grave: o lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico**. 1997. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, 1997.

GONÇALVES, R. C. O sistema respiratório na sanidade de bezerros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, 2009. Disponível em: <https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:EpbIrZspnVwJ:scholar.google.com/+pneumonia+enzootica+bovinos+brasil&hl=pt-BR&as_sdt=0,5>. Acesso em: 25 fev. 2016.

GONÇALVES, R. C. ; FEITOSA, F. L. F. Semiologia do sistema respiratório de grandes animais. In: FEITOSA, F. L. F. (Ed.). **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2008. p. 275–306.

GONÇALVES, R. C.; LISBOA, J. A. N.; SOUSA, M. V. de; ALMEIDA, C. T. de; KUCHEMBUCK, M. R. G.; CHIACCHIO, S. B. Aspectos clínicos e epidemiológicos da broncopneumonia dos bezerros em Botucatu, SP. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 144–147, 2000. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=302338&indexSearch=ID>>. Acesso em: 27 ago. 2014.

GONÇALVES, R. C.; LISBOA, J. A. N.; SOUZA, M. V.; ALMEIDA, C. T.; KUCHEMBUCK, M. R. G. Doenças de bezerro. Pneumonia. Aspectos clínicos e epidemiológicos na região de Botucatu. In: Congresso Internacional de Medicina Veterinária

em Língua Portuguesa, Salvador. **Anais...** Salvador: 1993.

GONÇALVES, R. C.; MATTOS, M. C. F. I.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; LOPES, R. S.; BORGES, A. S. Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 307–311, jun. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352004000300004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 fev. 2016.

GONÇALVES, R. C.; ROCHA, A. E. A.; SILVA, A. A. da; TAKAHIRA, R. K.; CHIACCHIO, S. B. Influência da suplementação de vitamina E na profilaxia e tratamento da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 127–135, fev. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 fev. 2016.

GOODBOURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDALL, R. E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 10, p. 2341–64, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993923>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. DETERMINATION OF SERUM PROTEINS BY MEANS OF THE BIURET REACTION. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1 fev. 1949. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/177/2/751.citation>>. Acesso em: 6 mar. 2016.

GRAHAM, B. S.; BUNTON, L. A.; WRIGHT, P. F.; KARZON, D. T. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 3, p. 1026–33, set. 1991. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

GRAY, D.; GRAY, M.; BARR, T. Innate responses of B cells. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 12, p. 3304–10, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000957>>. Acesso em: 27 fev. 2016.

GRELL, S. N.; RIBER, U.; TJØRNEHØJ, K.; LARSEN, L. E.; HEEGAARD, P. M. H. Age-dependent differences in cytokine and antibody responses after experimental RSV infection in a bovine model. **Vaccine**, v. 23, n. 26, p. 3412–23, 16 maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837365>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

GRETZ, J. E.; NORBURY, C. C.; ANDERSON, A. O.; PROUDFOOT, A. E. I.; SHAW, S. Lymph-Borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 10, p. 1425–1440, 13 nov. 2000. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/192/10/1425>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

GRIEBEL, P. J. Mucosal Vaccination of the Newborn: An Unrealized Opportunity. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 1–3, 9 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.8.1.1>>. Acesso em: 24 fev. 2016.

GRIEBEL, P. J.; BROWNLIE, R.; MANUJA, A.; NICHANI, A.; MOOKHERJEE, N.;

POPOWYCH, Y.; MUTWIRI, G.; HECKER, R.; BABIUK, L. A. Bovine toll-like receptor 9: a comparative analysis of molecular structure, function and expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 1-2, p. 11–6, 18 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098606>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

GRIFFIN, D. Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 57–71, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117542>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M. M.; KUSZAK, J.; MCVEY, D. S. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 381–94, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619191>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

GUARINO, H.; NÚÑEZ, A.; REPISO, M. V; GIL, A.; DARGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1-2, p. 34–40, 15 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587708000032>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

HÄGGLUND, S.; HU, K.-F.; LARSEN, L. E.; HAKHVERDYAN, M.; VALARCHER, J.-F.; TAYLOR, G.; MOREIN, B.; BELÁK, S.; ALENIUS, S. Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs--protection in the presence of maternal antibodies. **Vaccine**, v. 23, n. 5, p. 646–55, 16 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542185>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

HALL, C. B.; WALSH, E. E.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 4, p. 693–8, abr. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010624>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53–8, 8 fev. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2913161>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

HAUSER, M. A.; KOOB, M. D.; ROTH, J. A. Variation of neutrophil function with age in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 152–3, jan. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3946895>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

HERITAGE, P. L.; BROOK, M. A.; UNDERDOWN, B. J.; MCDERMOTT, M. R. Intranasal immunization with polymer-grafted microparticles activates the nasal-associated lymphoid tissue and draining lymph nodes. **Immunology**, v. 93, n. 2, p. 249–56, fev. 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1364185&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

HERITAGE, P. L.; UNDERDOWN, B. J.; ARSENAULT, A. L.; SNIDER, D. P.; MCDERMOTT, M. R. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 4 Pt 1, p. 1256–62, out. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351630>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

- HICKEY, M. C.; DRENNAN, M.; EARLEY, B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 11, p. 2847–55, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601889>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 82, n. 2, p. 253–9, 10 out. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4045201>>. Acesso em: 6 mar. 2016.
- HISHIKI, H.; ZUERCHER, A. W.; VALOSKY, J.; COFFIN, S. E. Regional differences in the early mucosal immune response induced by primary inoculation of mice with respiratory syncytial virus. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, n. 3, p. 141–6, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726231>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- HOLLING, T. M.; SCHOOTEN, E.; VAN DEN ELSEN, P. J. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. **Human Immunology**, v. 65, n. 4, p. 282–90, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120183>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 173–180, abr. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 9 mar. 2016.
- HUSSELL, T.; OPENSHAW, P. J. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. **The Journal of General Virology**, v. 79 (Pt 11), p. 2593–601, nov. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820134>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- JEYASEELAN, S.; SREEVATSAN, S.; MAHESWARAN, S. K. Role of Mannheimia haemolytica leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 69–82, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665107>>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- JIMÉNEZ, E.; SACEDÓN, R.; VICENTE, A.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, C.; ZAPATA, A. G.; VARAS, A. Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5005–13, 15 maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994452>>. Acesso em: 18 mar. 2016.
- JOHNSTON, R. B. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. **Current Opinion in Hematology**, v. 8, n. 1, p. 17–22, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138621>>. Acesso em: 26 fev. 2016.
- KALINA, W. V.; WOOLUMS, A. R.; GERSHWIN, L. J. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine influences antibody levels in bronchoalveolar lavage fluid and disease outcome in experimentally infected calves. **Vaccine**, v. 23, n. 37, p. 4625–4630, ago. 2005. Disponível

em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05004871>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

KAMPEN, A. H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T.; STORSET, A. K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1-2, p. 53–63, 15 set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772096>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

KAMPEN, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47–55, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251411>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

KAVANAGH, O. V.; ADAIR, B. M.; WELSH, M.; EARLEY, B. Immunogenetic responses in calves to intranasal delivery of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) epitopes encapsulated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 786–93, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890818>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 115–29, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062478>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

KENSIL, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 13, n. 1-2, p. 1–55, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853958>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, v. 8, n. 3, p. 223–46, ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946237>>. Acesso em: 30 set. 2015.

KIMMAN, T. G.; WESTENBRINK, F.; STRAVER, P. J. Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 22, n. 2, p. 145–60, set. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2530685>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

KIMMAN, T. G.; ZIMMER, G. M.; WESTENBRINK, F.; MARS, J.; VAN LEEUWEN, E. Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **The Veterinary Record**, v. 123, n. 4, p. 104–9, 23 jul. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3413952>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

KITCHEN, S. G.; JONES, N. R.; LAFORGE, S.; WHITMIRE, J. K.; VU, B.-A.; GALIC, Z.; BROOKS, D. G.; BROWN, S. J.; KITCHEN, C. M. R.; ZACK, J. A. CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 23, p. 8727–32, 8 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=423263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Annals of**

- Internal Medicine**, v. 93, n. 3, p. 480–9, set. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6254418>>. Acesso em: 26 fev. 2016.
- KOBZIK, L.; GODLESKI, J. J.; BRAIN, J. D. Selective down-regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-independent phagocytosis. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 11, p. 4312–9, 1 jun. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160498>>. Acesso em: 6 mar. 2016.
- KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **The Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 225–32, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474141>>. Acesso em: 6 mar. 2016.
- KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1325–34, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828640>>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- KUPER, C. F.; KOORNSTRA, P. J.; HAMELEERS, D. M.; BIEWENGA, J.; SPIT, B. J.; DUIJVESTIJN, A. M.; VAN BREDA VRIESMAN, P. J.; SMINIA, T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. **Immunology Today**, v. 13, n. 6, p. 219–24, jun. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1627250>>. Acesso em: 1 mar. 2016.
- LAMBERT, P.-H.; LIU, M.; SIEGRIST, C.-A. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? **Nature Medicine**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S54–62, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15812491>>. Acesso em: 1 fev. 2016.
- LAMICHHANE, A.; AZEGAMIA, T.; KIYONOA, H. The mucosal immune system for vaccine development. **Vaccine**, v. 32, n. 49, p. 6711–23, 20 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25454857>>. Acesso em: 19 dez. 2015.
- LEACH, R. J.; CHITKO-MCKOWN, C. G.; BENNETT, G. L.; JONES, S. A.; KACHMAN, S. D.; KEELE, J. W.; LEYMASTER, K. A.; THALLMAN, R. M.; KUEHN, L. A. The change in differing leukocyte populations during vaccination to bovine respiratory disease and their correlations with lung scores, health records, and average daily gain. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 8, p. 3564–73, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23736052>>. Acesso em: 11 mar. 2016.
- LEE, J. W.; PAAPE, M. J.; ELSASSER, T. H.; ZHAO, X. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2382–9, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906056>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- LEKEUX, P. Bovine Respiratory Disease Complex : An European Perspective. **Bovine Practitioner**, v. 29, 1995. Disponível em: <<http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/6486>>. Acesso em: 25 fev. 2016.
- LIEBLER-TENORIO, E. M.; PABST, R. MALT structure and function in farm animals. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 257–80, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611547>>. Acesso em: 1 mar. 2016.
- LIGGITT, H. D. Defense mechanisms in the bovine lung. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 1, n. 2, p. 347–66, jul. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2416410>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

- LIU, L.; LEHMKUHL, H. D.; KAEBERLE, M. L. Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions. **Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 63, n. 1, p. 41–48, 1999.
- LOHMANN-MATTHES, M.; STEINMULLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **The European Respiratory Journal**, v. 7, n. 9, p. 1678–1689, 1 set. 1994. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/content/7/9/1678>>. Acesso em: 26 fev. 2016.
- LYNCH, E. M.; EARLEY, B.; MCGEE, M.; DOYLE, S. Effect of post-weaning management practices on physiological and immunological responses of weaned beef calves. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 50, p. 161–174, 2011.
- MACH, J. P.; PAHUD, J. J. Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. **Journal of Immunology**, v. 106, n. 2, p. 552–63, fev. 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4100470>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- MARIN, M. S.; QUINTANA, S.; FAVERÍN, C.; LEUNDA, M. R.; ODEÓN, A. C.; PÉREZ, S. E. Toll-like receptor activation and expression in bovine alpha-herpesvirus infections. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 196–203, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24373725>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- MARINHO, M. Leptospirose: Fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428–434, 9 maio 2012. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/448>>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; DAVIS, D. G.; THOMSON, R. G.; JOHNSON, J. A.; LOPEZ, A.; STEPHENS, L.; CURTIS, R. A.; PRESCOTT, J. F.; ROSENDOL, S.; SAVON, M.; ZUBOIDY, A. J.; BOLTON, M. R. Factors associated with mortality in feedlot cattle: the bruce county beef cattle project. **The Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 1980.
- MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 13, p. 453–61, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981560>>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- MAWHINNEY, I. C.; BURROWS, M. R. Protection against bovine respiratory syncytial virus challenge following a single dose of vaccine in young calves with maternal antibody. **Veterinary Record**, v. 156, p. 139–143, 2005.
- MCGUIRK, S. M.; PEEK, S. F. Timely diagnosis of dairy calf respiratory disease using a standardized scoring system. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 15, n. 2, p. 145–7, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410122>>. Acesso em: 24 mar. 2016.
- MERCK. Merck animal health. **Respiratory vaccines**. Disponível em: <<http://www.merck-animal-health-usa.com/species/cattle/cow-calf.aspx>>. Acesso em: 29 fev. 2016.
- MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de; CRUVINEL, W. de M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. da. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010. Disponível em:

- <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-500420100005000008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 fev. 2016.
- MEYER, G.; DEPLANCHE, M.; SCHELCHER, F. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 2-3, p. 191–225, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17720245>>. Acesso em: 13 jan. 2016.
- MIRANDA, A. O. Epidemiology of cattle diseases in the northeast of La Pampa, Argentina. **Revista Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 81–86, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-68402014000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25 fev. 2016.
- MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 207–13, 10 set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072236>>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–69, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2724991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2014.
- MURPHY, K. Conceitos Básicos em Imunologia. In: MURPHY, K. (Ed.). **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 1–36.
- NAGAHATA, H.; KOJIMA, N.; HIGASHITANI, I.; OGAWA, H.; NODA, H. Postnatal changes in lymphocyte function of dairy calves. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 38, n. 1, p. 49–54, fev. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2063643>>. Acesso em: 18 mar. 2016.
- NALLY, J. E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X.-Y.; FISHBEIN, M. C.; PEREIRA, M. M.; DA SILVA, J. J. P.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 3, p. 1115–27, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1614724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- NASCIMBENI, M.; SHIN, E.-C.; CHIRIBOGA, L.; KLEINER, D. E.; REHERMANN, B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 478–86, 15 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044252>>. Acesso em: 1 fev. 2016.
- NAUSEEF, W. M.; CLARK, R. Granulocytic phagocytes. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Ed.). **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 7. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010.
- NORDENGRAHN, A.; RUSVAI, M.; MERZA, M.; EKSTRÖM, J.; MOREIN, B.; BELÁK, S. Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. **Veterinary Microbiology**, v. 51, n. 1-2, p. 55–68, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828122>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

- ORTOLANI, C.; FORTI, E.; RADIN, E.; CIBIN, R.; COSSARIZZA, A. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4+,CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 191, n. 2, p. 601–9, 15 mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8461016>>. Acesso em: 18 mar. 2016.
- OVERGAARD, N. H.; JUNG, J.-W.; STEPTOE, R. J.; WELLS, J. W. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 1, p. 31–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25360000>>.
- PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 597–627, 2003.
- PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777–89, 2 jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403834>>. Acesso em: 23 fev. 2015.
- PENTTILÄ, J. M.; PYHÄLÄ, R.; SARVAS, M.; RAUTONEN, N. Expansion of a novel pulmonary CD3- CD4+ CD8+ cell population in mice during chlamydia pneumoniae infection. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3290–3294, 1998.
- PIEPERS, S.; DE VliegHER, S.; DEMEYERE, K.; LAMBRECHT, B. N.; DE KRUIF, A.; MEYER, E.; OPSOMER, G. Technical note: Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 626–31, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164674>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- PLATT, R.; WIDEL, P. W.; KESL, L. D.; ROTH, J. A. Comparison of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4508–19, 16 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446589>>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- PRINGLE, J. K.; VIEL, L.; SHEWEN, P. E.; WILLOUGHBY, R. A.; MARTIN, S. W.; VALLI, V. E. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. **Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 52, n. 2, p. 239–48, abr. 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1255434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 fev. 2016.
- REBELATTO, M. C.; GUIMOND, P.; BOWERSOCK, T. L.; HOGENESCH, H. Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 83, n. 1-2, p. 93–105, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11604164>>.
- REBELATTO, M. C.; MEAD, C.; HOGENESCH, H. Lymphocyte populations and adhesion molecule expression in bovine tonsils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 1, p. 15–29, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524279900149X>>. Acesso em: 24 fev. 2016.

- REBER, A. J.; LOCKWOOD, A.; HIPPIEN, A. R.; HURLEY, D. J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 1-2, p. 139–50, 15 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169602>>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- RIDPATH, J. F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 41, n. 1, p. 14–9, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883306>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 259–62, 10 set. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285714808>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- ROMÁN, M.; CALHOUN, W. J.; HINTON, K. L.; AVENDAÑO, L. F.; SIMON, V.; ESCOBAR, A. M.; GAGGERO, A.; DÍAZ, P. V. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 1, p. 190–5, jul. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230746>>. Acesso em: 18 mar. 2016.
- ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; DEL SERO, G.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 5, p. 2356–62, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036985>>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhea virus with and without the administration of ACTH. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2366–72, dez. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6318614>>. Acesso em: 11 fev. 2016.
- ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L.; GRIFFITH, R. W. Effects of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 2, p. 244–50, fev. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266288>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- ROUSE, B. T.; GREWAL, A. S.; BABIUK, L. A.; FUJIMIYA, Y. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of herpesvirus-infected cells by complement. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 660–5, dez. 1977. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=421286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- SAMPAIO, I. B. . **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.
- SANDBULTE, M. R.; ROTH, J. A. T-cell populations responsive to bovine respiratory syncytial virus in seronegative calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 1-2, p. 111–123, 2002.
- SANDERS, M. T.; BROWN, L. E.; DELIYANNIS, G.; PEARSE, M. J. ISCOM-based vaccines: the second decade. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 2, p. 119–28, abr. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01319.x>>. Acesso em: 16

mar. 2016.

SASAKI, S.; SUMINO, K.; HAMAJIMA, K.; FUKUSHIMA, J.; ISHII, N.; KAWAMOTO, S.; MOHRI, H.; KENSIL, C. R.; OKUDA, K. Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 4931–9, jun. 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

SCHELCHER, F. **Infection experimentale par le virus respiratoire syncytial bovin: etude phenotypique des sous-populations lymphocytaires sanguines et du liquide de lavage broncho-alveolaire**. 1997. Thesis (PhD). Institut National Polytechnique Toulouse, 1997.

SCHELCHER, F. **Infectious bovine respiratory diseases: from immunology to vaccination**. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 28.2012, Lisboa. **Anais...** Lisboa; 2012.

SCHUH, J. C. L.; OLIPHANT, L. W. Development and immunophenotyping of the pharyngeal tonsil (adenoid) in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, n. 3, p. 229–241, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002199759290052V>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

SHEWEN, P. E.; CARRASCO-MEDINA, L.; MCBEY, B. a; HODGINS, D. C. Challenges in mucosal vaccination of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 192–8, 15 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046777>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

SHEWEN, P. E.; WILKIE, B. N. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. **Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 52, n. 1, p. 30–6, jan. 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1255396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

SIEGRIST, C. A. Vaccine immunology. In: PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W.; OFFIT, P. A. **Vaccines**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 17–36.

SILVA, B. T. **Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros holandeses**. 2015. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2015.

SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Compêndio de produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv.com.br/>>.

SINDRILARU, A.; PETERS, T.; WIESCHALKA, S.; BAICAN, C.; BAICAN, A.; PETER, H.; HAINZL, A.; SCHATZ, S.; QI, Y.; SCHLECHT, A.; WEISS, J. M.; WLASCHEK, M.; SUNDERKÖTTER, C.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 3, p. 985–97, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3049372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

- SIVULA, N. .; AMES, T. .; MARSH, W. .; WERDIN, R. . Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 27, n. 3-4, p. 155–171, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167587795010009>>. Acesso em: 21 mar. 2016.
- SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 12, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2829577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 fev. 2016.
- SLADEK, Z.; RYZNAROVA, H.; RYSANEK, D. Macrophages of the bovine heifer mammary gland: morphological features during initiation and resolution of the inflammatory response. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 35, n. 2, p. 116–24, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542177>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- SMITH, R. E.; DONACHIE, A. M.; GRDIC, D.; LYCKE, N.; MOWAT, A. M. Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 162, n. 9, p. 5536–46, 1 maio 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228035>>. Acesso em: 17 mar. 2016.
- SOUZA, F. N. **Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta immune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina**. 2010. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 273–81, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774966>>. Acesso em: 16 mar. 2016.
- STEP, D. L.; KREHBIEL, C. R.; DEPRA, H. A.; CRANSTON, J. J.; FULTON, R. W.; KIRKPATRICK, J. G.; GILL, D. R.; PAYTON, M. E.; MONTELONGO, M. A.; CONFER, A. W. Effects of Commingling Beef Calves from Different Sources and Weaning Protocols during a Forty-Two-Day Receiving Period on Performance and Bovine Respiratory Disease. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 3146–3158, 6 jun. 2008. Disponível em: <<https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/86/11/0863146>>. Acesso em: 8 jan. 2016.
- STOKKA, G.; GOLDSMITH, T. J. Feedlot Vaccination: Does It Really Matter? **The Veterinary Clinics of North America**. Food Animal Practice, v. 31, n. 2, p. 185–96, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26139186>>. Acesso em: 2 dez. 2015.
- STRASSER, A.; MAY, B.; TELTSCHER, A.; WISTRELA, E.; NIEDERMÜLLER, H. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, n. 3-4, p. 113–21, 15 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909408>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- TABATA, A.; KANEDA, K.; WATANABE, H.; ABO, T.; YANO, I. Kinetics of organ-associated natural killer cells and intermediate CD3 cells during pulmonary and hepatic

granulomatous inflammation induced by mycobacterial cord factor. **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 9, p. 651–8, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8908610>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

TABIASCO, J.; ESPINOSA, E.; HUDRISIER, D.; JOLY, E.; FOURNIÉ, J.-J.; VERCELLONE, A. Active trans-synaptic capture of membrane fragments by natural killer cells. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 5, p. 1502–8, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981839>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

TANAKA, N.; FUKUYAMA, S.; FUKUIWA, T.; KAWABATA, M.; SAGARA, Y.; ITO, H.; MIWA, Y.; NAGATAKE, T.; KIYONO, H.; KURONO, Y. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 14, p. 2680–7, 30 mar. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X06011339>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

TATEDA, K.; MOORE, T. A.; DENG, J. C.; NEWSTEAD, M. W.; ZENG, X.; MATSUKAWA, A.; SWANSON, M. S.; YAMAGUCHI, K.; STANDIFORD, T. J. Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 5, p. 3355–61, 1 mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207291>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

TAYLOR, G.; THOMAS, L. H.; STOTT, E. J. Effect of vaccination on cell populations in lung washes from calves after infection with respiratory syncytial virus. **Research in Veterinary Science**, v. 47, n. 2, p. 231–5, set. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2799080>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

TAYLOR, G.; THOMAS, L. H.; WYLD, S. G.; FURZE, J.; SOPP, P.; HOWARD, C. J. Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 6658–64, nov. 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

TAYLOR, J. D.; FULTON, R. W.; LEHENBAUER, T. W.; STEP, D. L.; CONFER, A. W. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? **The Canadian Veterinary Journal**. *La Revue Vétérinaire Canadienne*, v. 51, n. 10, p. 1095–102, out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2942046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

THOMAS, L. H.; COOK, R. S.; HOWARD, C. J.; GADDUM, R. M.; TAYLOR, G. Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus. **Research in Veterinary Science**, v. 61, n. 1, p. 38–44, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8819192>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

UW, University of Wisconsin. **Calf Respiratory Scoring Chart**. Disponível em: <https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/8calf/calf_respiratory_scoring_chart.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2016.

VALARCHER, J.-F.; HÄGGLUND, S. Vaccines and vaccination against viral diseases in cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 28.2012, Lisboa. **Anais...** Lisboa; 2012.

VAN DER POEL, W. H. M.; BRAND, A.; KRAMPS, J. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. **Journal of Infection**, v. 29, n. 2, p. 215–228, set. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445394908664>>. Acesso em: 8 fev. 2016.

VAN DER SLUIJS, M. T. W.; KUHN, E. M.; MAKOSCHEY, B. A single vaccination with an inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccine primes the cellular immune response in calves with maternal antibody. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 2, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/2>>. Acesso em: 22 abr. 2014.

VARELA, P. P. V.; FORTES, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146–154, 2001.

WAGNER, D. H. Re-shaping the T cell repertoire: TCR editing and TCR revision for good and for bad. **Clinical Immunology**, v. 123, n. 1, p. 1–6, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990051>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

WANG, M.; GAO, Z.; ZHANG, Z.; PAN, L.; ZHANG, Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 12, p. 3544–51, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4514083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

WEISS, L.; ROUX, A.; GARCIA, S.; DEMOUCHEY, C.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; KAZATCHKINE, M. D.; GOUGEON, M. L. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 4, p. 1158–62, out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806050>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

WELSH, M. D.; ADAIR, B. M.; FOSTER, J. C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 3-4, p. 195–210, jun. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7502482>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

WEST, K.; PETRIE, L.; KONOBY, C.; HAINES, D. M.; CORTESE, V.; ELLIS, J. A. The efficacy of modied-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. **Vaccine**, v. 18, n. 9-10, p. 907–919, 2000.

WHALE, T. A.; BESKORWAYNE, T. K.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. Bovine polymorphonuclear cells passively acquire membrane lipids and integral membrane proteins from apoptotic and necrotic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 6, p. 1226–33, 1 jun. 2006a. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/content/79/6/1226.full>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

WHALE, T. A.; GRIEBEL, P. J. A sheep in wolf's clothes: can neutrophils direct the immune response? **Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 169–77, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296086>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

- WHALE, T. A.; WILSON, H. L.; TIKOO, S. K.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. Pivotal Advance: passively acquired membrane proteins alter the functional capacity of bovine polymorphonuclear cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 3, p. 481–91, 1 set. 2006b. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/content/80/3/481.full>>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- WONG, L. B.; YEATES, D. B. Stimulation of tracheal ciliary beat frequency by localized tissue incision. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, n. 1, p. 411–6, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2312485>>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- WOOD, D.; QUIROZ - ROCHA, G. F. Normal Hematology of Cattle. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa: Blackwell, 2010. p. 829–835.
- WOOLUMS, A. R.; BERGHAUS, R. D.; BERGHAUS, L. J.; ELLIS, R. W.; PENCE, M. E.; SALIKI, J. T.; HURLEY, K. A. E.; GALLAND, K. L.; BURDETT, W. W.; NORDSTROM, S. T.; HURLEY, D. J. Effect of calf age and administration route of initial multivalent modified-live virus vaccine on humoral and cell-mediated immune responses following subsequent administration of a booster vaccination at weaning in beef calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 2, p. 343–54, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23363363>>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- WOOLUMS, A. R.; BROWN, C. C.; BROWN, J. C.; COLE, D. J.; SCOTT, M. A.; WILLIAMS, S. M.; MIAO, C. Effects of a single intranasal dose of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccine on resistance to subsequent viral challenge in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 3, p. 363–72, mar. 2004a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15027687>>. Acesso em: 3 ago. 2014.
- XUE, W.; ELLIS, J.; MATTICK, D.; SMITH, L.; BRADY, R.; TRIGO, E. Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. **Vaccine**, v. 28, n. 22, p. 3784–92, 14 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381643>>. Acesso em: 1 fev. 2016.
- YEO, S. P.; STOKES, C. R.; TAYLOR, F. G.; BOURNE, F. J. Maturation of cellular defence in the respiratory tract of young calves. **Research in Veterinary Science**, v. 55, n. 3, p. 292–7, nov. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284491>>. Acesso em: 4 ago. 2014.
- ZHANG, Z.; BASHIRUDDIN, J. B.; DOEL, C.; HORSINGTON, J.; DURAND, S.; ALEXANDERSEN, S. Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 1, p. 56–62, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423571>>. Acesso em: 3 ago. 2014.