JÉSSYCA BERALDI BELLINAZZI

Perfil das proteínas de fase aguda em animais experimentalmente infectados com *Mannheimia haemolytica*

São Paulo
2018

JÉSSYCA BERALDI BELLINAZZI

Perfil das proteínas de fase aguda em animais experimentalmente infectados com *Mannheimia haemolytica*

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

Departamento:

Departamento de Clínica Veterinária

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo

2018

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. 3629
FMVZ

Bellinazzi, Jéssyca Beraldi
Perfil das proteínas de fase aguda em animais experimentalmente infectados com
Mannheimia haemolytica / Jéssyca Beraldi Bellinazzi. -- 2018.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Proteínas de fase aguda. 2. Pneumonia. 3. Imunologia. 4. Bem-estar animal.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Perfil das proteínas de fase aguda frente à resposta inflamatória em bovinos experimentalmente infectados com *Mannheimia haemolytica*", protocolada sob o CEUA nº 7075050216, sob a responsabilidade de **Alice Maria Melville Paiva Della Libera e equipe; Jessyca Beraldi Bellinazzi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Profile of acute phase proteins against inflammatory response in cattle experimentally infected with *Mannheimia haemolytica*", utilizing 12 Bovines (12 males), protocol number CEUA 7075050216, under the responsibility of **Alice Maria Melville Paiva Della Libera and team; Jessyca Beraldi Bellinazzi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2016** a **02/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 8 meses**

N: **12**

Linhagem: **Bovino Preto e Branco**

Peso: **400 a 900 kg**

Resumo: O presente estudo tem por proposta avaliar o desempenho das proteínas de fase aguda em bovinos frente à um estímulo com *Mannheimia haemolytica*.

Local do experimento: Hospital de Ruminante do HOVET

São Paulo, 15 de fevereiro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Autor: BELLINAZZI, Jéssyca Beraldi

Título: Perfil das proteínas de fase aguda em animais experimentalmente infectados com *Mannheimia haemolytica*

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Ao meu irmão Anderson Leandro Bellinazzi (in memorian) e
minha avó Leonor Buci Bellinazzi (in memorian) que são
minhas inspirações.*

*Meus pais Angelo e Maria José, irmãos e toda família, meus
alicerces, pelo apoio e compreensão nos momentos de minha
ausência.*

Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

*Amo vocês!
E... à vocês eu Dedico!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois tudo o que tenho e tudo o que sou é graças a Ele. Agradeço-lhe imensamente por me dar força, sabedoria e humildade quando achava que não suportaria, mas hoje estou vencendo mais uma batalha graças a ti.

À toda minha família (Pai, mãe, irmãos, avós, tios, primos, sobrinhos, amigos) agradeço pela compreensão e todas as palavras de incentivos e desculpem-me pelas minhas ausências, nunca esquecerei de vocês.

À professora Alice Maria Melville Paiva Della Libera que além de orientadora é uma segunda mãe, pela amizade, orientação, paciência, atenção e conhecimento transmitido, contribuindo para minha formação pessoal e profissional, estando ao meu lado em todos os momentos e acreditando em minha capacidade.

Ao Carlos Augusto pelo amor, companheirismo e dedicação irrestrita nos momentos mais difíceis.

À CAPES e ao programa de pós-graduação pelo apoio financeiro e científico para realização desta pesquisa nesse período do estudo e a FAPESP pelo auxílio concedido (Processo n° 12/00749-9).

À todos meus amigos da pós graduação, uns de perto e outros de longe, que em todos os momentos estiveram ao meu lado, dando forças, compartilhando dificuldades, alegrias, ajudando quando preciso, muito obrigada pela convivência nesses anos.

À toda minha equipe por todo apoio e solidariedade em todos os momentos difíceis e felizes, pelas conquistas, pelas risadas e por cada palavra ou gesto de

carinho ao longo desses anos. Vocês são incríveis e nada teria sido conquistado dessa maneira sem a ajuda de todos vocês.

Ao professor Dr. Adroaldo José Zanella, toda sua equipe e família (Marcia, Isadora e Mauricio), sem palavras para agradecer toda a contribuição pessoal e profissional.

Aos professores que me acolheram tão bem e cederam um espaço em suas agendas e seus laboratórios para me ajudarem, Juliana Peiró, Paulo Henrique Mazza, Luciana Casimiro da Costa, Francisco Palma Rennó, Viviani Gomes, Wilson Roberto Fernandes.

A todos vocês o meu muito obrigada!

*“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior.
Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança
e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica.
O impossível torna-se possível com a força de vontade.”*

Dalai Lama

RESUMO

BELLINAZZI, J. B. Perfil das proteínas de fase aguda em animais experimentalmente infectados com *Mannheimia haemolytica* [Profile of acute phase proteins in animals experimentally infected with *Mannheimia haemolytica*]. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A manheimiose pneumônica bovina (MPB) gera significativa lesividade quando predomina no Complexo Doença Respiratória Bovina. Visto isso, considera-se importante o estudo do diagnóstico precoce para melhor estadiamento e tratamento da doença. As concentrações plasmáticas e séricas das proteínas de fase aguda (PFA) têm sido adotadas na medicina veterinária como marcadores precoces de doenças inflamatórias e algumas vezes, relacionadas ao bem-estar animal. O presente estudo objetivou revisar o painel inflamatório da MPB; investigar a contribuição que o emprego da flunixinina meglumina no tratamento de bovinos manifestando MPB; e investigar marcadores inflamatórios para o diagnóstico precoce da doença e evolução do tratamento, empregando referências de bem estar animal. Para isto foram utilizados 12 bezerros da raça holandesa com seis meses de idade, hígidos e divididos em dois grupos experimentais, o primeiro tratado com antimicrobiano e o segundo com antimicrobiano e anti-inflamatório. Os animais foram submetidos à inoculação intratraqueal de *M. haemolytica* e tiveram suas amostras de lavado broncoalveolar e de sangue colhidas em quatro momentos, onde foram realizados exame clínico, coleta de sangue e lavado broncoalveolar para realização de hemograma, determinação das proteínas de fase aguda, análise de cortisol e cortisona. A análise estatística foi realizada utilizando programa SAS 9.3 para Windows. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de *Shapiko Wilk*, considerando significância de 5%. Foi efetuada a análise de variância simples com comparação entre médias por meio do teste de LSD, sendo considerado significativo $p < 0.05$. Os resultados mostraram que a MPB é uma doença de grande importância no cenário mundial; não foram encontradas diferenças estatísticas entre os marcadores precoces entre os grupos com ou sem anti-inflamatório, porém o uso concomitante com o antimicrobiano promoveu incremento do bem estar.

Palavras-chave: proteínas de fase aguda, pneumonia, imunologia, bem estar animal

ABSTRACT

BELLINAZZI, J. B. Profile of acute phase proteins in animals experimentally infected with *Mannheimia haemolytica*. [Perfil das proteínas de fase aguda em animais experimentalmente infectados com *Mannheimia haemolytica*] 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The bovine pneumonic mannheimiosis (MPB) generates significant lesivity when it predominates in the Complex Bovine Respiratory Disease. Thus being important the study of the previous diagnosis for better understanding and treatment of the disease. As plasma and serum concentrations of acute phase proteins (PFA) have been adopted in veterinary medicine as early markers of inflammatory diseases and sometimes related to animal welfare. The aim of the study was review the inflammatory panel of MPB; to investigate a contribution that the use of flunixin meglumina without treatment of bovines manifesting MPB; and to investigate inflammatory markers for the previous diagnosis of the disease and treatment evolution, using references of animal welfare. Twelve six-month-old, healthy and divided into two experimental groups, the first treated with antimicrobial and the second with antimicrobial and anti-inflammatory were used in this study. The animals were submitted to intratracheal inoculation of *M. haemolytica* and had their bronchoalveolar lavage and blood samples collected at four moments, where clinical examination, blood collection and bronchoalveolar lavage were carried out to perform hemogram, determination of the acute phase proteins, analysis of cortisol and cortisone. Statistical analysis was performed using SAS 9.3 software for Windows. The data were tested for normality by the Shapiro Wilk test, considering a significance of 5%. The analysis of simple variance was performed with a comparison of means by means of the LSD test, being considered significant $p < 0.05$. The results showed that MPB is a disease of great importance in the world scenario; no statistical differences were found between the early markers between the groups with or without anti-inflammatory, but the concomitant use with the antimicrobial promoted an increase in animal welfare.

Keywords: acute phase proteins, pneumonia, immunology, animal welfare

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Descrição do experimento.....	30
Figura 2 - Esquema de produção das proteínas de fase aguda.....	42
Figura 3 - Delineamento experimental do estudo.....	45
Figura 4 – Descrição do processamento da eletroforese em SDS-PAGE.....	49
Figura 5 - Foto do gel de eletroforese	50
Figura 6 – Análise gráfica do gel de eletroforese de um animal submetido a inoculação intratraqueal de <i>Mannheimia haemolytica</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado das médias dos valores de cortisona medidos no soro de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por <i>Mannhemia haemolytica</i> – São Paulo - 2018.....	34
Tabela 2- Resultado das médias dos valores de cortisona medidos no lavado broncoalveolar de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por <i>Mannhemia haemolytica</i> – São Paulo - 2018.....	34
Tabela 3- Resultado das médias dos valores de cortisol medidos no soro de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por <i>Mannhemia haemolytica</i> – São Paulo - 2018.....	35
Tabela 4- Resultado das médias dos valores de cortisol medidos no lavado broncoalveolar de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por <i>Mannhemia haemolytica</i> – São Paulo - 2018.....	35
Tabela 5- Expressão da haptoglobina sérica em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	51
Tabela 6- Expressão da haptoglobina sérica em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroide em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.....	51
Tabela 7- Diferença estatística haptoglobina	52
Tabela 8- Expressão da glicoproteína em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina megluminal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	53

Tabela 9- Expressão da glicoproteína em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroideal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	53
Tabela 10- Diferença estatística glicoproteína	54
Tabela 11- Expressão da ceruloplasmina em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	55
Tabela 12- Expressão da ceruloplasmina em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroideal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	55
Tabela 13- Diferença estatística ceruloplasmina.....	56
Tabela 14- Expressão da transferrina em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	57
Tabela 15- Expressão da transferrina em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroideal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	57
Tabela 16- Diferença estatística transferrina.....	58
Tabela 17- Expressão da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.....	59
Tabela 18- Expressão da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroideal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	60

Tabela 19- Diferença estatística transferrina.....	61
Tabela 20- Expressão da albumina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados flunixinina megluminal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.....	61
Tabela 21- Expressão da albumina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	62
Tabela 22- Diferença estatística albumina	63
Tabela 23- Expressão da glicoproteína no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.....	63
Tabela 24- Expressão da glicoproteína no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de <i>Mannheimia haemolytica</i> em bezerros.	64
Tabela 25- Diferença estatística glicoproteína	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Concentração dos valores de cortisona sanguíneos e do lavado broncoalveolar de cortisona encontrados em 12 animais submetidos a inoculação intratraqueal de <i>Mannheimia haemolytica</i> . Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.	34
Quadro 2 –Concentração dos valores de cortisol sanguíneos e do lavado broncoalveolar encontrados em 12 animais submetidos a inoculação intratraqueal de <i>Mannheimia haemolytica</i> , durante quatro momentos diferentes. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.....	35
Quadro 3 –Valores da média e mediana do peso corporal, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal encontrados em 12 animais submetidos a inoculação intratraqueal de <i>Mannheimia haemolytica</i> , durante quatro momentos diferentes. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.	36
Quadro 4 – Principais proteínas e suas funções	42

LISTA DE SIGLAS

Alfa-1 Glicoproteína Ácida	AGP
Amilóide A Sérica	SAA
Antiinflamatórios Não Esteróideais	AINEs
Ceruloplasmina	CP
Complexo Doença Respiratória Bovina	CDBR
Coronavírus Bovino	BCV
Dodecil Sulfato de Sódio	SDS
Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio	SDS-PAGE
Glicoproteína Ácida	AGP
Haptoglobina	Hp
Herpes Vírus Bovino 1	BHV-1
Mannheimiose Pneumônica Bovina	MPB
Proteína C Reativa	PCR
Proteínas de Fase Aguda	PFA
Uma vez ao dia	SID
Vírus da Parainfluenza Bovina 3	BPIV-3
Vírus Sincicial Respiratório Bovino	BRSV

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PAINEL DA INFLAMAÇÃO PULMONAR EM BOVINOS INFECTADOS COM <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i>.....	18
2.1	INTRODUÇÃO	18
2.2	MECANISMOS DE DEFESA PULMONAR	19
2.3	IMPACTO ECONÔMICO DA MANNHEIMIOSE.....	20
2.4	PATOGENICIDADE DA MANNHEIMIA HAEMOLYTICA	21
2.5	RESPOSTA IMUNE/ INFLAMATÓRIA	23
2.6	CONCLUSÃO.....	25
2.7	REFERÊNCIAS.....	26
3.	EFICÁCIA CLÍNICA DA FLUNIXINA MEGLUMINA COMO ADJUNTO AO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO EM UM QUADRO DE PNEUMONIA INDUZIDA COM <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i>	28
3.1	INTRODUÇÃO	28
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.5	CONCLUSÃO.....	38
3.6	REFERÊNCIAS.....	39
4.	BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS PRECOCES EM BEZERROS TRATADOS COM FLUNIXINA MEGLUMINA EM MANNHEIMIOSE PNEUMONICA	40
4.1	INTRODUÇÃO	40
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.5	CONCLUSÃO.....	67
4.4	REFERÊNCIAS.....	68
5.	CONCLUSÕES GERAIS	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias, são responsáveis por grandes perdas econômicas na bovinocultura (GONÇALVES et al., 2000; ACKERMANN et al., 2010) e dentre as afecções do sistema respiratório, a mais comum é o Complexo Doença Respiratória Bovina (CDRB) ou a Pneumonia Enzoótica dos Bovinos (AMES; BAKER; WIKSE, 2006). O CDRB corresponde à inflamação dos bronquíolos, parênquima e pleura decorrente de uma diminuição dos mecanismos de defesa locais, quer de origem físicas, químicas ou microbiológicas, favorecendo a invasão por agentes infecciosos, disponíveis no ambiente (MARGARIDO et al., 2008), constituindo gargalo à pecuária, no âmbito nacional e internacional (GONÇALVES et al., 2000).

Dentre os microrganismos responsáveis pelo CDRB, cita-se principalmente a *Mannheimia haemolytica*, habitante normal da nasofaringe microbiota comensal oportunista de bovinos, que nas situações de menor efetividade dos mecanismos de defesa do trato respiratório, atinge regiões mais profundas, causando a Mannheimiose Pneumônica Bovina (MPB) (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

A MPB é a broncopneumonia de maior prevalência e impacto econômico atribuídas ao CDRB (LILLIE, 1974; REHMTULLA & THOMSON, 1981; RADOSTITS et al, 2000, SMITH, 2001). No ano de 1998, somente a MPB foi responsabilizada por prejuízos da ordem 800 milhões de dólares nos Estados Unidos (WEEKLEY et al., 1998a). Pequenos rebanhos bovinos e lotes de grandes propriedades de produção de leite ou de confinamentos de gado de corte são igualmente acometidos pela MPB (BROGDEN et al., 1998). No Brasil, levantamentos realizados no Estado de São Paulo obtiveram taxas de incidência de broncopneumonias em bezerros de 12,7% na região de Araçatuba (BARROS et al., 1965/66) e de 12,27% na região de Botucatu (GONÇALVES et al., 2000). Na Clínica de Bovinos de Garanhuns – UFRPE, as broncopneumonias foram a principal causa de atendimento e/ou internamento de bovinos jovens (BARROS et al., 1994).

Diante desse alerta e da estimativa de produção de 51,7 milhões de bezerros/ano no Brasil (ANUALPEC, 2013), num rebanho bovino de aproximadamente 212,3 milhões de cabeças (IBGE, 2015), a MPB pode ser considerada uma doença potencialmente importante para o Brasil.

Circunstancialmente, a *M. haemolytica* causa pneumonias graves normalmente acompanhadas de exsudato fibrinonecrótico e hemorragia alveolar. Durante sua multiplicação, há liberação de toxinas neuromidases, proteases e leucotoxinas que interferem diretamente na ativação de fagócitos deflagrando uma resposta inflamatória de maior ou menor intensidade (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

Nos casos de pneumonia em bezerro leiteiro, o diagnóstico e o tratamento baseiam-se principalmente na observação de sintomas clínicos, tais como depressão e aumento da temperatura corporal combinado com sinais de doenças específicas. No entanto, em muitos casos, os bezerros doentes apresentam sintomas leves que podem passar despercebidas em um grupo grande (GANHEIM et al., 2003).

As concentrações plasmáticas e séricas das proteínas de fase aguda (PFA) têm sido adotadas na medicina veterinária como marcadores de doenças inflamatórias. A determinação sérica dessas contribui para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças, além de contribuírem como indicativo de bem-estar animal (MURATA et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2007; JAIN et al., 2011; CRAY, 2012; PROHL et al., 2015).

Foi relatado que as proteínas de fase aguda demonstram rápida e precisamente doenças infecciosas e inflamatórias, mas não a causa. Faz-se importante o conhecimento, visto que doenças subclínicas causam uma taxa de crescimento reduzida e perdas na produção. Clinicamente são indicadores de prognóstico e tratamento (TOTHOVÁ et al., 2013). A magnitude e a duração da resposta de fase aguda refletem a gravidade da inflamação e danos do tecido subjacente (HEEGAARD et al., 2000).

Neste contexto, uma característica muito importante das PFA é a possibilidade de detectar doenças precocemente, a fim de se evitar perdas na produção (CERÓN et al., 2005), como mastite, doenças reprodutivas, gastrointestinais (CECILLIANI et al., 2012), além de efeitos de dieta e fatores ligados a estresse como vacinação, transporte, temperatura e vírus (YUN et al., 2014).

Para tanto se faz necessário o uso dessas PFA, promovendo uma detecção precoce, isolamento e tratamento dos animais doentes, já que são encontradas aumentadas no soro dos bovinos em diversas doenças, incluindo doenças das vias

respiratórias induzidas experimentalmente e/ou de ocorrência natural (THOTOVÁ et al., 2013).

É importante reconhecer que na resposta de fase aguda de diversas doenças, as concentrações de proteína são elevadas considerando assim uma baixa especificidade diagnóstica preliminar para uma determinada doença. Porém, pode-se relacionar com uma alta especificidade para detecção de inflamação ou infecção (CERON et al., 2005).

No início de doenças inflamatórias e infecciosas, as PFA se elevam no soro, mantem-se elevadas no decorrer da doença e diminuem seus níveis em resposta ao tratamento. Portanto, são bons marcadores de diagnostico, prognostico e de monitorização do tratamento (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2003).

Em resposta a inflamação, há edema do tecido e pode ser associado com a dor, febre. Com isso, o uso do anti-inflamatorio em adjunto a terapia antimicrobiana, tem o objetivo de reduzir a febre, resposta inflamatória pulmonar e promover a melhora sintomática por meio do retorno do apetite e disposição do animal (MAZZUCHELLI et al., 1995; REBHUN, 2000; RADOSTITS et al., 2002), propiciando assim um bem estar para os animais. Além disso, Os animais doentes devem ser mantidos em abrigos limpos, secos, ventilados, com temperatura e umidade adequados, confortáveis e livres de poeira. A alimentação deve ser palatável, sem purulência e a água fresca e abundante (RADOSTITS et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do anti-inflamatório não esteroideal (flunixinina meglumina) na mannheimiose respiratória bovina, por meio de marcadores de infecção e inflamação, bem como avaliar a dinâmica da inflamação aguda, efeitos do anti-inflamatório no perfil sistêmico e local das principais proteínas de fase aguda e avaliar indicadores de bem-estar animal

2 PAINEL DA INFLAMAÇÃO PULMONAR EM BOVINOS INFECTADOS COM *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*

2.1 INTRODUÇÃO

O trato respiratório possui um sistema imune bastante dinâmico composto por camadas que interagem contra patógenos inalados. No entanto, a eficiência das múltiplas defesas são suscetíveis a diversos desafios como resultado ao estresse, infecções a patógenos, temperatura ambiente e má circulação do ar, entre outros (AMES; BAKER; WIKSE, 2006). Quando algumas dessas defesas são superadas, os pulmões podem ser colonizado por patógenos primariamente ou secundariamente, resultando no desenvolvimento de um quadro pneumônico (GONÇALVES et al., 2000; AMES; BAKER; WIKSE, 2006; MARGARIDO et al., 2008; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

Esse perfil multifatorial é considerado complexo de doença respiratória bovina (CDRB). É um paradigma para as interações entre fatores predisponentes e patógenos. A importância dos fatores predisponentes disponíveis em diferentes sistemas de produção fez com que esse CDRB recebesse muitas vezes denominações diversas como pneumonia da febre do transporte em bovinos de confinamento, pneumonia enzoótica em bezerros de leite e pneumonia em vacas adultas, ficando claro que pode também afetar o gado em outros sistemas de produções, sinalizando que a relação de fatores predisponentes e determinantes superam as defesas locais.

Os patógenos bacterianos que causam as doenças respiratórias no rebanho bovino incluem: *Mannheimia haemolytica*, *Bibersteinia trehalosi*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* e *Trueperella* (anteriormente *Arcanobacterium*) *pyogenes*, bem como o vírus herpes vírus bovino 1 (BHV-1), o vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), vírus da parainfluenza bovina 3 (BPIV-3) e coronavírus bovino (BCV) (GONÇALVES et al., 2000; AMES; BAKER; WIKSE, 2006; MARGARIDO et al., 2008).

Dentre os microrganismos responsáveis pelo CDRB, cita-se principalmente a *Mannheimia haemolytica*, habitante normal da nasofaringe de bovinos, que nas

situações de menor efetividade dos mecanismos de defesa do trato respiratório, atinge regiões mais profundas, causando a Mannheimiose Pneumônica Bovina (MPB) (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011). A combinação de diferentes fatores como algumas atividades relacionadas ao estresse, desmame e transporte a longas distâncias, clima frio, mudanças repentinas, aglomerados, condições ambientais estressantes, animais imunologicamente susceptíveis, contato direto, má higiene, má ventilação, juntamente com associação de microorganismos patogênicos, podem acarretar na instalação e disseminação da doença. (HOERLEIN e MARSH, 1957; KING et al., 1958; JENSEN, 1968; SWEAT, 1968; JENSEN et al., 1976; IRWIN et al., 1979; BUSSING e SELF, 1981; SNOWDER et al., 2006).

A MPB causa uma broncopneumonia acompanhada por tosse úmida e dolorosa, além disso a resposta inflamatória por si só causa dor, febre e aumento de cortisol sérico (CERON et al., 2005). A inflamação aguda causada pela MPB é uma resposta normal do organismo animal frente a infecção. O seu papel principal é manter a integridade do tecido, limitando os danos para o local (GRUYS et al., 2006).

2.2 MECANISMOS DE DEFESA PULMONAR

Os mecanismos de defesa do trato respiratório são variados e têm como função a inativação das partículas e microrganismos inalados.

Os pulmões dos bovinos possuem uma característica peculiar em relação às demais espécies de animais. Há ausência de ventilação colateral interalveolar e interbronquiolar, assim, a alta taxa de ventilação e a forte resistência ao fluxo de ar no interior das vias aéreas posteriores, tornam os bovinos mais suscetíveis às doenças respiratórias (LEKEUX, 1994).

Os mecanismos de defesa do trato respiratório dos ruminantes se dividem em três processos básicos:

- (1) físicos: com a presença do aparelho mucociliar e a filtração aerodinâmica;
- (2) secretórios: representados pelas proteínas do surfactante, imunoglobulinas IgA e IgG, peptídeo antimicrobiano traqueal, peptídeos catiônicos, peroxidase, lactoferrina, lisozima, proteína indutora de permeabilidade bacteriana-1, proteína inibidora de leucoprotease secretória e outras substâncias solúveis presentes no líquido de revestimento do epitélio respiratório;

(3) celulares: representados principalmente pelos macrófagos alveolares pulmonares (MAPs), células que mantêm a integridade pulmonar devido à capacidade de destruir microrganismos, atuar como célula assessora em respostas imunes, recrutar e ativar outras células inflamatórias e manter e reparar o parênquima pulmonar (MANZ-KEINLE et al., 1982; WILKIE, 1982; ANDERSON et al., 1986; BROGDEN, 1992; BROGDEN et al., 1997; BROGDEN et al., 1998; ACKERMANN & BROGDEN, 2000; RADOSTITS et al., 2000; SMITH, 2001).

Os macrófagos, contendo material fagocitado no espaço alveolar, caminham para o bronquíolo terminal, atingem o sistema mucociliar e são expelidos. Outros macrófagos são levados pelos vasos linfáticos até os linfonodos. Ainda, outras partículas podem penetrar o espaço intersticial, alcançando os vasos linfáticos, indo diretamente aos linfonodos, sendo eliminados (FEITOSA, 2008).

Os anticorpos também representam forte barreira à penetração de microrganismos no pulmão, existindo grandes secreções de imunoglobulinas A (IgA) no trato aéreo anterior. Nos pulmões, é maior a quantidade de imunoglobulinas do Tipo G (IgG). Todos esses mecanismos de defesa são afetados por vários fatores endógenos e exógenos: agentes químicos, ar poluído, desidratação, friagem, infecções concorrentes, desnutrição, distúrbios metabólicos associados a alterações agudas ou crônicas como uremia, acidose e desequilíbrio hormonal. Além disso, o sistema fagocitário pode estar deprimido por drogas imunossupressoras, citotóxicas e por radiações que provocam depleção da medula óssea, fonte de macrófagos e neutrófilos (FEITOSA, 2008).

2.3 IMPACTO ECONÔMICO DA MANNHEIMIOSE

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com 212,3 milhões de cabeças, apresentando um aumento de 25% de 2000 a 2015. É o maior exportador de carne bovina do mundo desde o ano de 2008, sendo estimado o crescimento de 2,15% ao ano (IBGE, 2015).

Neste cenário, as doenças respiratórias, são responsáveis por grandes perdas econômicas na bovinocultura (GONÇALVES et al., 2000; ACKERMANN et al., 2010)

Altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas às enfermidades respiratórias contribuem para diminuição da produtividade do rebanho. O impacto

econômico negativo por sua vez, ocorre pela perda de peso, conversão alimentar ineficiente, aumento dos custos de produção por mão de obra e tratamentos (SNOWDER et al., 2006).

Estima-se que a perda de receita devido à CDRB no Brasil pode ser de US \$ 14,334.00/10000 bovinos associados à mortalidade, enquanto que a morbidade relacionada ao CDRB foi estimada em US \$ 16,315.40/10000 bovinos (BAPTISTA et al., 2017).

Segundo Weekley et al. (1998) somente a MPB foi responsável por perdas econômicas da ordem 800 milhões de dólares nos Estados Unidos. Pequenos rebanhos bovinos e lotes de grandes propriedades de produção de leite ou de confinamentos de gado de corte são igualmente acometidos pela MPB (BROGDEN et al., 1998). No Brasil, levantamentos realizados no Estado de São Paulo apresentaram taxas de incidência de broncopneumonia em bezerros de 12,7% na região de Araçatuba (BARROS et al., 1965/66) e 12,27% na região de Botucatu (GONÇALVES et al., 2000). Já no estado do Pernambuco, as broncopneumonias foram as principais causas de atendimento e/ou internamento de bovinos jovens (BARROS et al., 1994).

2.4 PATOGENICIDADE DA MANNHEIMIA HAEMOLYTICA

A Mannheimiose Pneumonica Bovina (MPB) é a broncopneumonia de maior prevalência e impacto econômico dentro do CDRB (RADOSTITS et al, 2000, SMITH, 2001).

Circunstancialmente, a *M. haemolytica* causa pneumonias severas, normalmente acompanhadas de exsudato fibrinonecrótico e hemorragia alveolar. Isso ocorre porque durante sua multiplicação, há liberação de toxinas neuromidases, proteases e leucotoxinas que interferem diretamente na ativação de fagócitos deflagrando uma resposta inflamatória de maior ou menor intensidade (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

As infecções pulmonares causadas por ela se caracterizam por uma resposta inflamatória fibrinosa supurativa e necrotizante, de caráter superagudo a agudo. Dentro de horas após a infecção, os brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares ficam recobertos de infiltrados de neutrófilos, fibrina, líquido sero proteico e sangue. O exsudato está associado à necrose parenquimal extensa, que é causada por

produtos da *M. haemolytica* A1 como a leucotoxina, o lipopolissacarídeo e o polissacarídeo capsular, e também por fatores inflamatórios liberados por neutrófilos e outras células do processo inflamatório agudo (SLOCOMBE et al., 1985).

Macroscopicamente, a broncopneumonia fibrinosa lobular aguda se caracteriza por intensa congestão e hemorragia, que conferem aos pulmões uma coloração vermelha típica, e por abundante exsudação de fibrina, que pode se acumular nas superfícies pleurais formando espessas placas amarelas, e acúmulo de quantidades variáveis de líquido amarelo na cavidade torácica (SLOCOMBE et al., 1984b; CARLTON & McGAVIN, 1995; WHITELEY et al., 1991a,b; RADOSTITS et al., 2000).

O processo inflamatório não se limita a um único lóbulo pulmonar, envolvendo lóbulos contíguos até acometer todo o lobo. Quando a área pulmonar total acometida pela broncopneumonia fibrinosa é igual 30%, ou menos, os sinais clínicos e a morte podem resultar de toxemia grave (CARLTON & McGAVIN, 1995; RADOSTITS et al., 2000).

Microscopicamente, a broncopneumonia fibrinosa lobar aguda é caracterizada por maciça exsudação de proteínas plasmáticas para o interior dos brônquios, bronquíolos e alvéolos e, conseqüentemente, pela obliteração da maioria dos espaços aéreos com exsudato fluido (REHMTULLA & THOMSON, 1981; SLOCOMBE et al., 1984; WHITELEY et al., 1991; CARLTON & McGAVIN, 1995).

Em geral, ocorre acentuada dilatação e trombose de vasos linfáticos e distensão dos septos interlobulares por edema e exsudato fibrinocelular. Áreas focais de necrose coagulativa também são comuns e os centros necróticos, envolvendo um grupo de alvéolos, são delineados por capilares congestos e repletos de fibrina, material proteico, colônias bacterianas, eritrócitos, neutrófilos e macrófagos (REHMTULLA & THOMSON, 1981; SLOCOMBE et al., 1984; WHITELEY et al., 1991; CARLTON & McGAVIN, 1995; BROGDEN et al., 1998; ACKERMANN & BROGDEN, 2000).

Próximo à margem da lesão, o exsudato contendo neutrófilos e macrófagos forma uma transição abrupta para o pulmão normal, sem cápsula de tecido fibroso (REHMTULLA & THOMSON, 1981; ALLAN et al., 1985; BROGDEN et al., 1998). Nos animais que sobrevivem ao estágio agudo da MPB, a necrose pulmonar muitas vezes

causa sequestros, que são fragmentos de tecido pulmonar necrótico encapsulado por tecido conjuntivo (CARLTON, McGAVIN, 1995).

2.5 RESPOSTA IMUNE/ INFLAMATÓRIA

A resposta imune é dividida em: resposta inata e resposta adquirida. A imunidade inata não requer exposição prévia a um agente patogênico para que ele seja efetivo. Não é, portanto, uma resposta antígeno específica. A imunidade inata é uma categoria ampla que inclui barreiras protetoras, como pele e mucosa (KANEKO, 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2014).

A inflamação é um componente crítico do sistema de defesa inato que envolve respostas biológicas complexas de fatores celulares e solúveis, seguindo locais de lesão tecidual ou trauma. O objetivo das respostas inflamatórias do hospedeiro é eliminar a origem da lesão tecidual, restaurar a homeostase imune e retornar os tecidos à função normal. A cascata inflamatória resulta não apenas na escalada de fatores antimicrobianos locais, mas também no aumento do movimento de leucócitos e componentes de plasma do sangue em tecidos infectados (AITKEN et al., 2011; RYMAN et al., 2015a; SORDILLO, 2016).

Fagócitos são componentes importantes da imunidade inata, e os desencadeadores iniciais para a infecção é geralmente o leucócito polimorfonuclear ou neutrófilo. Essas células participam de fagocitose e morte de bactérias. A outra população de fagócitos é o macrófago. Esta célula desempenha um papel não apenas como um fagócito, geralmente agindo em uma área de inflamação após o neutrófilo, mas também como uma ligação vital à resposta imune adquirida. Os macrófagos funcionam como células apresentadoras de antígenos (KANEKO, 2008).

A resposta imune adaptativa é desencadeada quando os mecanismos imunes inatos não conseguem eliminar um patógeno. Ela é caracterizada pela geração de linfócitos específicos para antígeno e células de memória com capacidade para reconhecer determinantes antigênicos específicos de um patógeno. Quando células e tecidos hospedeiros são re-expostos ao mesmo antígeno, um estado elevado de reatividade imune ocorre como consequência da memória imunológica e expansão clonal de células efectoras específicas do antígeno (SORDILLO, 2016).

Uma resposta imune de memória é muito mais rápida, mais forte, mais duradoura e mais efetiva na remoção de um patógeno invasor em comparação com uma resposta imune primária.

Basicamente, as pneumonias são provocadas pela reação inflamatória decorrente da penetração de um agente infeccioso no trato respiratório inferior. O processo pelo qual a doença se desenvolve varia entre os agentes e sua virulência, bem como a porta de entrada da infecção (RADOSTITS et al., 2002).

A maior parte dos mediadores de resposta imune é constituída por proteínas. Após a injúria tecidual o organismo responde de forma imediata, produzindo agentes de resposta de fase aguda. Dentre eles destacam-se as proteínas de fase aguda (PFA), indispensáveis para o restabelecimento da homeostasia corporal (CERÓN et al., 2005).

Após o estímulo gerado pelas citocinas, principalmente a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), liberadas por células de defesa. O fígado sintetiza e libera a maioria das PFA, o que resulta no seu aumento na corrente sanguínea (PETERSEN et al., 2004).

As PFA são um grupo de proteínas do sangue que contribuem para o restabelecimento da homeostase, limitando o crescimento bacteriano de forma independente dos anticorpos, que aparecem logo após a instalação de processos inflamatórios, infecção, trauma cirúrgico, estresse e neoplasias (MURATA et al., 2004)

As citocinas inflamatórias contribuem para a patogênese da mannheimiose, por meio do recrutamento de neutrófilos, ativação dos leucócitos, e a indução de uma ampla gama de mediadores inflamatórios solúveis, que durante a doença aumentam a expressão pulmonar de factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 beta (IL-1 β) e Interleucina-8 (IL-8) (MORSEY et al., 1999; MALAZDREWICH et al., 2001).

A exposição do animal a *M. haemolytica* causa rápida infiltração de neutrófilos para o pulmão e aumento acentuado na proporção de neutrófilos/macrófagos no LBA. Essas mudanças se correlacionam com alterações histológicas como infiltrados inflamatórios no alvéolos e presença de exsudato fibrinonecrótico (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005). Essa migração de neutrófilos contribui para o desenvolvimento do dano tecidual. Assim, a interação patógeno-hospedeiro é entre LKT e leucócitos polimorfonucleares (PMN) e a resposta inflamatória mediada por neutrófilos em si, parece ser um determinante importante da patogênese da mannheimiose (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005).

2.6 CONCLUSÃO

A manheimiose pneumônica é reconhecida como um gargalo atual à pecuária nacional e internacional, deflagra uma resposta inflamatória lesiva que gera perdas econômicas. Seus aspectos inflamatórios com importância diagnóstica e impacto em bem estar animal devem ser estudados.

2.7 REFERÊNCIAS

ACKERMAN, M. R.; DERSCHIED, R.; ROTH, J. A. **Innate immunology of Bovine Respiratory Diseases**. Veterinary Clinical Food Animals, v. 26, p. 215-228, 2010.

AMES, T. R.; BAKER, J. C.; WIKSE, S. E. **As broncopneumonias (Complexo de Doenças Respiratórias de Bovinos, Ovinos e Caprinos)**. Medicina interna de grandes animais. 3º ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 511-570.

BAPTISTA, A.L. et al. **Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from Southeastern Brazil**. The Journal of Infection in Developing Countries, Accept for publication, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Produção de carne no Brasil aumenta 45% em 15 anos**. Brasília, 2016.

Bussing, C. E. and H. Self. 1981. **Changing structure of the beef industry in Kansas**. Trans. Kan. Acad. Sci. 84:173.

COUTINHO, A.S. **Mannheimiose Pneumônica Experimentalmente Induzida em Bezerros pela Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica A1- Cepa D153: Achados do exame físico, hemograma e swabs nasal e nasofaríngeo**. 2004. 186p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estado Paulista, Botucatu.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico**. 2ed. Roca, 2008

GÂNHEIM, C.; HULTÉN, C.; CARLSSON, U.; KINDAHL, H., NISKANEN, R.; WALLER, K.P. **The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or Mannheimia haemolytica**. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. v. 50, n.4, p. 183-190, 2003.

GONÇALVES, R. C.; LISBÔA, J. A. N.; SOUSA, M. V.; A. C. T.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; C. S. B. **Aspectos clínicos e epidemiológicos da broncopneumonia dos bezerros em Botucatu, SP**. Revista Brasileira de Ciências Veterinárias. v. 7, p. 144-147, 2000.

Hoerlein, A. B. and C. L. Marsh. 1957. **Studies on the epizootiology of shipping fever in calves**. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 131 : 123.

IBGE. **Indicadores IBGE/Estatística da Produção Pecuária - Setembro de 2015**. Brasília-DF, 2015. Disponível em: <
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201502_publ_completa.pdf >. Acesso em: 20 jan. 2016.

IRWIN, M. R., S. MCCONNELL, J. D. COLEMAN AND G. E. WILCOX. 1979. **Bovine respiratory disease complex: A comparison of potential predisposing and etiologic factors in Australia and the United States**. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 175:1095.

JENSEN, R. 1968. **Scope of the problem of bovine respiratory disease in beef cattle.** J. Amer. Vet. Med. Assoc. 152:720. SWEAT, 1968;

JENSEN, R., R. E. PIERSON, P. M. BRADDY, D. A. SAARI, L. H. LAVERMAN, J. J. ENGLAND, H. KEYVANFAR, J. R. COLLIER, D. P. HORTON, A. E. MCCHESENEY, A. BENITEZ AND R. M. CHRISTIE. 1976. **Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle.** J. Amer. Vet. Med. Assoc. 169:500

KING, N. B., C. GALE, H. R. SMITH, A. H. HAMDY, V. L. SANGER, W. D. POUNDEN AND E. W. KLOSTERMANN. 1958. **Stress factors in shipping fever.** Vet. Med. 53:67.

LEKEUX, P. **Síndrome Respiratória dos Bovinos: Uma Perspectiva Européia. Simpósio Internacional Sobre Doença Respiratória Bovina.** Congresso Mundial de Buiaria, França, p. 7-13, 1994.

MARGARIDO, R. S.; NETO, D. L.; FERREIRA, F. V. **Doenças Respiratórias dos Bovinos.** Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária. ISSN: 1679-7353, ano VI –n. 10, janeiro de 2008

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M.D.; CERÓN, J.J. **Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria.** Anales de Veterinaria. 2001, 17: 99.

MURPHY, K. Conceitos Básicos em Imunologia. In: MURPHY, K. (Ed.). **Imunobiologia de Janeway.** 8ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 1–36.

SINGH, K.; RITCHEY, J.W.; CONFER, A.W. **Mannheimia haemolytica: Bacterial-Host interactions in bovine pneumonia.** Veterinary Pathology, v.48, n.2, p.338-348, 2011.

SNOWDER, G.D., VAN VLECK, L.D., CUNDIFF, L.V. & BENNETT, G.L. (2006). **Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic and economic factors.** Journal of Animal Science, 84 (8), 1999-2008.

3. EFICÁCIA CLÍNICA DA FLUNIXINA MEGLUMINA COMO ADJUNTO AO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO EM UM QUADRO DE PNEUMONIA INDUZIDA COM *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*

3.1 INTRODUÇÃO

O bem estar animal é um conceito bastante difundido e aceito dentre os sistemas de produção animal. BROOM (1986) define que: “bem-estar de um indivíduo é seu estado em relação às tentativas de se adaptar ao seu ambiente”, ou seja, a forma como o animal se encontra relacionado ao ambiente onde vive, sua facilidade ou dificuldade para adaptar-se e demonstrar conforto no ambiente em que está inserido. O bem-estar de um animal inclui seu estado físico e mental. De forma que, quando inserido em um sistema de produção, garantirá que os animais estejam protegidos de sofrimento desnecessário. Segundo BRAMBELL (1965), o bem-estar de um animal, seja em fazenda, em trânsito, no mercado ou em um local de abate deve considerar as “cinco liberdades”, são elas: livre de fome e sede, livre de desconforto, livre de dor, ferimentos e doenças, livre para expressar seu comportamento e livre de medo e angústia.

A aplicação do bem estar aos animais exige investimentos financeiros, para que se ofereça conforto necessário ao animal (MOLENTO, 2005). Porém, a adoção desses sistemas representam maior retorno econômico, diminuindo perdas na produção.

A ocorrência de doenças nos rebanhos pode implicar em custos elevados aos produtores, bem como resultar em sérios problemas inerentes ao bem-estar animal (GANHEIM et al. 2007). O complexo de doenças respiratórias bovinas (CDRB) é uma entidade multifatorial, uma vez que existe interação entre fatores de estresse e susceptibilidade do hospedeiro a agentes virais e bacterianos (DEDONDER & APLEY, 2015; BAPTISTA et al., 2017).

Eventos estressantes predis põem animais jovens a doença respiratória bovina. O estresse pode alterar a função imune, potencialmente comprometendo o bem-estar

do animal aumentando a probabilidade de desenvolver CDRB (BUCKHAM SPORER et al., 2008).

O tratamento do CDRB baseia-se predominantemente no uso de agentes antimicrobianos, com os principais objetivos de redução rápida da pirexia (BALMER et al., 1997) e melhora nos sinais clínicos e função pulmonar (LOCKWOOD et al., 2003).

A administração concomitante de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como adjuvante a terapia antimicrobiana tornou-se uma prática comum no tratamento do CDRB nos últimos 30 anos, devido aos seus efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios (GUZEL et al., 2010). O flunixinina meglumina tem sido amplamente utilizado, pois foi o primeiro AINE licenciado no início dos anos 80 (BALMER et al., 1997).

Devido a inflamação causada pela MPB, resulta em edema do tecido e pode ser associado a dor. As respostas sistêmicas são mais lentas e envolvem dor, mediada por cininas e febre, mediada por citocinas, entre elas: IL-1, IL-6; que induzem a liberação de cortisol (MARCELLO, 2013). Tendo em vista isso, a utilização da flunixinina meglumina torna-se de grande valia para quadros de MPB, melhorando o bem estar dos animais.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso do anti-inflamatório não esteroidal, flunixinina meglumina, como tratamento adjunto de um antimicrobiano em um quadro de mannhemiose pneumônica em bovinos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – *campus* São Paulo. Aprovado pelo comitê de ética sob o número CEUA N 7075050216.

Animais empregados e critérios de inclusão

Foram utilizados 12 bezerros machos da raça Holandesa Preta e Branca, com seis meses de idade, hígidos e divididos em dois grupos experimentais. Os animais foram submetidos à inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*¹ (Figura1).

Figura 1 – Descrição do experimento

Os animais foram mantidos em baias com piso emborrachado, a limpeza foi realizada diariamente e repetida sempre que necessário. No primeiro momento, os animais foram submetidos ao exame físico, hemograma, exame coproparasitológico,

¹ ATCC 33396

e broncoscopia. Como critério de inclusão, foram incluídos no estudo os animais que não apresentarem alterações nos exames descritos anteriormente.

Exame Físico

Os animais foram avaliados diariamente pelos métodos semiológicos classicamente preconizados por DIRKSEN (1993), no qual foram realizadas as seguintes avaliações: funções vitais (frequências respiratória, frequência cardíaca e temperatura corporal), estado de hidratação e avaliação das mucosas aparentes e linfonodos. Posteriormente, foi realizado o exame específico do sistema respiratório, com o emprego dos diferentes meios semiológicos como a inspeção, palpação, percussão, auscultação e olfação (GONÇALVES e FEITOSA, 2008).

A inspeção indireta foi realizada por meio da endoscopia, de acordo com BATISTA et al. (2012).

Coleta de Sangue e de Lavado Broncoalveolar

Em cada momento foram coletadas duas amostras de sangue de cada bezerro, por meio de *vacutainer*, a primeira em tubo sem anticoagulante para as dosagens de cortisol e cortisona, a segunda em tubo com EDTA dipotássico para realização de hemograma.

O lavado broncoalveolar foi obtido através de broncoscopia de acordo com BATISTA et al. (2012). No material coletado, foram dosados cortisol, cortisona e confeccionadas lâminas de microscopia por citocentrifugação do lavado para a contagem diferencial.

Concentração do Lavado Broncoalveolar

Para realizar a concentração das amostras de lavado broncoalveolar foi utilizado o equipamento de vácuo² por pelo menos quatro horas a 45°C. Após isso, as amostras foram submetidas a dosagem de concentração de proteína total por meio de refratômetro.

² Vacufuge vaccum concentrator - Eppendorf®

Extração dos Corticoides

Para a realização da extração da matriz proteica foram utilizados as amostras de soro e lavado broncoalveolar. A técnica utilizada foi a mesma descrita por GRAHAN et al. (2001), modificada. Foi adicionado acetato de etila nas amostras de soro e lavado broncoalveolar, em seguida foi feita a mistura usando agitador (vórtex) em velocidade máxima, mantendo-se o mínimo de amostras aderidas à parede. As alíquotas foram centrifugadas por 20 minutos em uma velocidade de 10.000g. Em seguida as amostras foram retiradas e congeladas a fim de obter uma melhor separação do sobrenadante, após isso o líquido foi retirado e colocado em outros dois eppendorfs. As amostras foram deixadas *overnight*, abertas em uma capela de fluxo até a completa secagem das amostras, após isso o material foi congelado para posterior análise.

Dosagem de uréia

Foram utilizadas 400µl de amostras de soro e lavado broncoalveolar, dos eppendorfs que estavam armazenados a -80°C, para a dosagem de ureia. A mensuração foi feita com a ajuda do equipamento RANDOX³.

Análise de Cortisol e Cortisona

A análise de cortisol e cortisona das amostras foram realizadas pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA) competitivo pelo protocolo desenvolvido na Universidade de Medicina Veterinária de Vienna - Áustria (PALME et al., 2013). Este protocolo consiste na utilização de um anticorpo secundário (IgG de cabra (molécula inteira) anti-IgG de coelho, não conjugado⁴) (que irá recobrir a superfície da placa, permitindo a ligação das demais moléculas para que a reação aconteça), anticorpo específico (para cortisol e cortisona), cortisol e cortisona conjugado com biotina (molécula que irá competir com o cortisol e cortisona presente na amostra pelo sítio ativo do anticorpo específico), padrões com uma quantidade conhecida de cortisol (para gerar uma curva de concentração), streptavidina (enzima que tem afinidade pela biotina, ocorrendo assim uma ligação entre as moléculas de cortisol conjugado com

³ Randox RX Daytona Chemistry Analyzer

⁴ Interprise

biotina e a streptavidina) e peroxidase (substrato que confere luminescência às moléculas de streptavidina)

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas em um delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Os resultados obtidos foram através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA). Para verificar a distribuição das variáveis, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de *Shapiko Wilk*, considerando significância de 5%. Foi efetuada a análise de variância simples com comparação entre médias através do teste de LSD, sendo considerado significativo $p < 0.05$.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos encontram-se descritos nas tabelas e quadros abaixo.

Quadro 1 – Concentração dos valores de cortisona sanguíneos e do lavado broncoalveolar de cortisona encontrados em 12 animais submetidos a inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.

Cortisona Soro					Cortisona BAL			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
A1	14.17	20.96	25.80	17.17	787.78	3319.25	1373.90	143.91
A2	12.70	18.99	23.09	13.42	781.30	265.19	1191.35	404.94
A3	14.69	45.47	67.88	7.00	1692.75	398.31	+	588.82
A4	2.80	6.15	8.83	11.94	654.21	2320.79	154.04	616.04
A5	59.14	21.30	49.29	32.61	538.35	3329.01	1422.37	6.60
A6	27.05	44.75	74.22	16.19	1111.10	10719.24	1708.92	531.60
A7	24.61	36.43	19.96	10.47	+	2389.24	275.82	544.97
A8	15.49	6.82	9.83	19.15	657.49	-	531.30	309.61
A9	55.30	151.41	19.63	23.79	10736.24	10558.50	1512.16	955.23
A10	23.09	60.15	89.51	12.44	1681.91	2715.27	1261.55	2993.57
A11	14.69	10.45	38.79	+	+	185.38	467.52	220.61
A12	19.96	+	44.04	53.74	1518.04	9666.46	1821.86	451.64

Tabela 1- Resultado das médias dos valores de cortisona medidos no soro de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por *Mannheimia haemolytica* – São Paulo - 2018

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	3,116	2,868	2,992	0,209	0,557
M2	3,202	3,297	3,249	0,215	0,827
M3	3,875	3,070	3,472	0,209	0,063
M4	3,083	2,746	2,914	0,217	0,445
Media	3,319	2,995			
Tempo	0,1233		Tempo*Trat	0,2004	
AICC	94,9		Matriz	Banded Toeplitz	

Tabela 2- Resultado das médias dos valores de cortisona medidos no lavado broncoalveolar de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por *Mannheimia haemolytica* – São Paulo - 2018

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	6,840	7,240	7,040	0,369	0,592
M2	7,648	7,600	7,624	0,354	0,945
M3	7,121	6,415	6,768	0,354	0,326
M4	5,196	6,556	5,876	0,339	0,053
Media	6,701	6,953			
Tempo	0,003		Tempo*Trat	0,127	
AICC	129,2		Matriz	Compound Symmetry	

Quadro 2 –Concentração dos valores de cortisol sanguíneos e do lavado broncoalveolar encontrados em 12 animais submetidos a inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*, durante quatro momentos diferentes. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.

Cortisol Soro					Cortisol BAL			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
A1	31.10	47.77	27.86	20.47	164.60	1198.86	183.38	68.40
A2	4.80	14.94	21.76	7.95	305.00	53.32	206.16	246.58
A3	26.18	11.38	56.71	10.70	3105.25	629.69	375.44	271.49
A4	20.91	11.02	49.05	14.00	375.75	752.47	352.33	460.77
A5	405.79	5.92	40.71	13.17	488.58	1837.18	526.56	37.59
A6	76.21	56.71	24.53	24.26	1248.40	-	384.71	218.78
A7	26.18	17.56	10.08	27.10	23.90	1061.40	208.42	318.93
A8	0.00	40.38	97.71	16.54	4239.66	-	341.67	28.44
A9	26.18	0.00	36.61	51.41	4643.71	-	1810.38	1094.47
A10	21.19	18.89	32.70	26.80	568.91	698.54	415.30	264.75
A11	11.14	42.25	51.41	16.54	506.27	148.38	319.30	134.62
A12	12.26	24.67	54.81	49.84	1720.00	1191.52	1491.30	346.35

Tabela 3- Resultado das médias dos valores de cortisol medidos no soro de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por *Mannhemia haemolytica* – São Paulo - 2018

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	3,701	2,425	3,063	0,354	0,095
M2	3,234	2,481	2,875	0,303	0,238
M3	3,728	3,529	3,629	0,167	0,565
M4	3,033	3,064	3,048	0,184	0,935
Media	3,424	2,875			
Tempo	0,1261		Tempo*Trat	0,4552	
AICC	119,2		Matriz	Heterogeneous Symetry	Compound

Tabela 4- Resultado das médias dos valores de cortisol medidos no lavado broncoalveolar de bezerros durante quatro momentos de uma infecção experimental por *Mannhemia haemolytica* – São Paulo - 2018

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	6,692	6,335	6,513		0,598
M2	6,628	6,034	6,331		0,452
M3	6,074	5,985	6,030		0,895
M4	4,942	5,563	5,252		0,362
Media	6,084	5,979			
Tempo	0,062		Tempo*Trat	0,643	
AICC	132,2		Matriz	Variance Components	

Quadro 3 –Valores da média e mediana do peso corporal, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal encontrados em 12 animais submetidos a inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*, durante quatro momentos diferentes. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.

Momento			PESO (kg)	FC (bpm)	FR (mrpm)	Temp (°C)
ATB + AINE	1	Média	192.67	84.00	32.00	39.07
ATB + AINE		Mediana	190.00	82.00	32.00	39.00
ATB	1	Média	169.67	85.00	39.67	39.06
ATB		Mediana	175.00	84.00	40.00	39.00
ATB + AINE	2	Média	192.67	84.17	50.33	39.83
ATB + AINE		Mediana	190.00	88.00	51.00	39.90
ATB	2	Média	169.67	90.83	59.33	39.83
ATB		Mediana	175.00	85.50	58.00	39.60
ATB + AINE	3	Média	196.80	94.00	34.67	39.18
ATB + AINE		Mediana	209.00	92.00	40.00	39.05
ATB	3	Média	172.40	89.33	49.33	39.00
ATB		Mediana	189.00	88.00	50.00	39.00
ATB + AINE	4	Média	207.67	90.67	38.67	38.73
ATB + AINE		Mediana	215.50	90.00	38.00	38.60
ATB	4	Média	176.42	91.33	42.67	38.95
ATB		Mediana	183.25	90.00	44.00	39.00

Legenda: ATB+AINE: grupo usado antimicrobiano em adjunto ao anti-inflamatório
ATB: grupo utilizado apenas antimicrobiano

A dosagem de uréia foi utilizada para correção e normalização dos valores encontrados no lavado broncoalveolar em comparação ao soro dos animais.

Para identificação do CDRB, alguns sinais clínicos são encontrados como: perda do apetite, mudança no padrão respiratório e temperatura corporal alterada (Griffin, 2014). Os sinais clínicos encontrados nos animais durante o desenvolvimento da pesquisa está descrito no Quadro 3. Os animais tratados com adjunto do anti-inflamatório apresentaram um padrão clínico melhor em relação aos tratados apenas com antimicrobiano.

De acordo com CERON et al., (2005) um dos efeitos causados pela resposta inflamatória aguda é o aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda e cortisol sanguíneo; discordando desse estudo, já que não foi encontrado diferença estatística no cortisol sérico dos animais.

Os animais apresentaram uma diferença estatística nos valores de cortisona sérico no momento 3, uma semana após a infecção. O grupo tratado sem AINE apresentou um valor maior de cortisona.

Porém, no momento 4, podemos observar que os animais tratados com o anti-inflamatório obtiveram um maior valor de cortisona no lavado broncoalveolar,

resultando assim em uma melhora para o animal e consequentemente um melhor bem estar.

Estatisticamente os animais tratados com o AINE não apresentaram diferença, entretanto podemos observar que esses animais apresentaram valores menores de cortisol em relação ao grupo que não foi utilizado o AINE.

3.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que é indicado o uso concomitante da flunixinina meglumina, ao tratamento antimicrobiano por terem sido observados benefícios ao quadro geral e marcador de bem estar (cortisona).

3.6 REFERÊNCIAS

Balmer TV, Williams P, Selman IE. **Comparison of carprofen and flunixin meglumine as adjunctive therapy in bovine respiratory disease.** Vet J 1997;154:233–241. 5.

Brambell Report, 1965. Report of the Technical Committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. Her Majesty's Stationery Office, London, UK

Broom, D.M., 1986 Indicators of poor welfare. British Veterinary Journal, 142, 524–526

GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; WALLER, K. P. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. The Veterinary Journal, London, v. 173, p. 645-651, 2007.

Grahan L, Schwarzenberger F, Möstl E, Galama W, Savage A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. Zoo Biol. 2001 Aug;20(3):227-36.

Griffin, D. 2014. The monster we don't see: subclinical BRD in beef cattle. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 15: 138 141.

Guzel; M; MC Karakurum; R Durguta; N Mamak. **Clinical efficacy of diclofenac sodium and flunixin meglumine as adjuncts to antibacterial treatment of respiratory disease of calves.** Australian Veterinary Journal Volume 88, No 6, June 2010.

Lockwood PW, Johnson JC, Katz TL. **Clinical efficacy of flunixin, carprofen and ketoprofen as adjuncts to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease.** Vet Rec 2003;152:392–394.

MOLENTO, C.F.M. Bem-estar e produção animal: aspectos econômicos – revisão. Archives of Veterinary Science, v.10, n.1, p.1-11, 2005.

PALME R, TOUMA C, ARIAS N, DOMINCHIN M, LEPSCHY N Steroid extraction: get the best out of faecal samples. Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria 100: 238–246; 2013.

4. BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS PRECOSES EM BEZERROS TRATADOS COM FLUNIXINA MEGLUMINA EM MANNHEIMIOSE PNEUMONICA

4.1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos mediadores de resposta imune é constituída por proteínas. Mulder, em 1839, criou o termo “proteína”; palavra originária do grego *proteios*, que significa “primário”, “essencial”. As proteínas são formadas por compostos orgânicos de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre, e é o principal constituinte dos organismos vivos (TORRES, 2008; AURÉLIO, 2011). Após a injúria tecidual o organismo responde de forma imediata, produzindo agentes de resposta de fase aguda. Dentre eles destacam-se as proteínas de fase aguda (PFA), indispensáveis para o restabelecimento da homeostasia corporal (CERÓN et al., 2005).

A crescente preocupação com a rapidez na identificação e resolução de problemas sanitários nos rebanhos aumentou o interesse no estudo de biomarcadores precoces no cenário da buiatria mundial. Essa necessidade motivou pesquisas realizadas nas últimas décadas a quantificar PFA, no plasma ou no soro sanguíneo, para contribuir no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças (ECKERSALL, 2000; GONZÁLEZ et al. 2007).

As concentrações destas proteínas se alteram em ruminantes submetidos à cirurgia, estresse e, principalmente, enfermidades infecciosas ou inflamatórias. Relata-se que estas proteínas podem ser consideradas indicadores potenciais de doenças inflamatórias ou do bem-estar em animais, individualmente ou em rebanho (MURATA et al. 2004).

Analiticamente, PFA apresentam boa relação custo – benefício e, para separação dessas proteínas, utiliza-se uma técnica simples que separa por cargas elétricas (OLIVEIRA et al., 2015). Segundo ECKERSALL (2008), o fracionamento de proteínas representa um dos métodos mais confiáveis de identificação das mesmas. A composição química das proteínas como carga elétrica e peso molecular, determina sua migração eletroforética (NAOUM, 1990).

O uso dessa técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) permite a identificação de 20 a 30 proteínas com um

custo relativamente baixo, enquanto que outras técnicas só permitem a visualização de cinco a sete grupos (MATTEWS, 1982; EDINGER et al., 1992; GORDON, 1995). É uma técnica relativamente simples de ser realizada, que possibilita a avaliação de concentrações séricas de proteínas mesmo em concentrações baixas. O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente anfipático cuja função é desnaturar as proteínas e convertê-las numa estrutura linear e torná-las carregadas negativamente, para que, quando submetidas ao gel de poliacrilamida, migrem para o pólo positivo, sendo que a velocidade desta migração depende do seu peso molecular (LAEMMLI, 1970).

Durante uma resposta de fase aguda frente a uma inflamação e infecção aguda, diversas proteínas podem ser liberadas com alterações fisiológicas e bioquímicas, cada proteína tem um comportamento diferente dependendo de sua classificação, podendo aumentar ou diminuir (CECILIANI et al., 2002; MURATA et al., 2004). As proteínas de fase aguda podem ser classificadas quanto a concentração (positivas ou negativas), modo de ação e mecanismos de síntese (JAIN et al., 2011).

Como exemplos de proteínas positivas temos a proteína C reativa (PCR), a alfa-1 antitripsina, o fibrinogênio, a ferritina, a amilóide A sérica (SAA), a ceruloplasmina (CP), a haptoglobina (Hp) e a alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) (CERÓN et al., 2005; KANEKO et al., 2008, JAIN et al., 2011). Dentre as negativas podemos citar a albumina e a transferrina (JAIN et al., 2011) (Quadro 4).

Quanto ao modo de ação podemos dividir em: inibidores da protease (alfa-1 antitripsina); proteínas de coagulação (fibrinogênio); proteínas de transporte (haptoglobina e ceruloplasmina).

Em relação aos mecanismos de síntese podem ser por produção hepática pelos hepatócitos ou ocorrer a estimulação extra-hepática (JAIN et al., 2011) (Figura 2).

Albumina	<ul style="list-style-type: none"> • proteína mais abundante no plasma, constitui importante reserva proteica, bem como transportadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio, hormônios e bilirrubina, além de participar da regulação do pH sanguíneo. O seu aumento ocorre exclusivamente em situações de desidratação
Glicoproteína ácida	<ul style="list-style-type: none"> • atividade imunomoduladora, de reparo e de cicatrização; agente anti-inflamatório e imunomoduladoras, aumenta a secreção da IL-1
Haptoglobina	<ul style="list-style-type: none"> • transporte de hemoglobina. Marcador de infecção bacteriana (efeito bacteriostático, imunomodulatório)
Ceruloplasmina	<ul style="list-style-type: none"> • transporte de cobre, essencial para a eritropoiese, com efeito antioxidante nas células e tecidos, a fim de protegê-los de compostos gerados pela fagocitose de microrganismos
Transferrina	<ul style="list-style-type: none"> • transporte de ferro. Atua no controle da absorção do ferro intestinal bem como na sua distribuição no organismo
Imunoglobulina A	<ul style="list-style-type: none"> • proteção de mucosas
Imunoglobulina G	<ul style="list-style-type: none"> • agente infeccioso tóxico
Amilóide Sérico A	<ul style="list-style-type: none"> • possui efeito anti-inflamatório, acarreta adesão e quimiotaxia de células fagocitárias e linfócitos

Quadro 4 – Principais proteínas e suas funções

Figura 2 - Esquema de produção das proteínas de fase aguda.
 Fonte: Adaptado de JAIN et al. (2011).

Neste contexto, uma característica muito importante das PFA é a possibilidade de detectar doenças precocemente, a fim de se evitar perdas na produção (CERÓN et al., 2005), como mastite, doenças reprodutivas, gastrointestinais (CECILLIANI et al., 2012), além de efeitos de dieta e fatores ligados a estresse como vacinação, transporte, temperatura e vírus (YUN et al., 2014).

Para tanto se faz necessário o uso dessas PFA em MPB, promovendo uma detecção precoce, isolamento e tratamento dos animais doentes, já que são encontradas aumentadas no soro dos bovinos em diversas doenças, incluindo doenças das vias respiratórias induzidas experimentalmente e/ou de ocorrência natural (THOTOVÁ et al., 2013).

Alguns estudos foram realizados com as proteínas de fase aguda em humanos (VOLP et al., 2008), equinos (HULTÉN et al., 1999), bovinos para doenças como diarreia viral bovina (GANHEIN et al., 2003), estresse e outras doenças (TOTHOVÁ et al., 2013; YUN et al., 2014), e doenças respiratórias (IDOATE et al., 2014), porém em âmbito nacional, a literatura é escassa e por isso o presente estudo pretende contribuir para melhor compreensão de seus mecanismos bem como para o diagnóstico precoce e o estadiamento mais preciso para manheimiose pneumônica bovina, considerando que é uma enfermidade que causa muitos prejuízos econômicos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – campus São Paulo, aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação animal nº 7075050216.

Animais empregados e critérios de inclusão

Foram utilizados 12 bezerros machos da raça Holandesa Preta e Branca, com seis meses de idade, hígidos e divididos em dois grupos experimentais. Os animais foram submetidos à inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*⁵(Figura3).

Os grupos foram divididos da seguinte maneira: grupo 1 era composto de animais tratados com antibiótico e o grupo 2 eram os animais tratados com antibiótico e anti-inflamatório.

Os animais foram mantidos em baias com piso emborrachado, a limpeza foi realizada diariamente e repetida sempre que necessário. No primeiro momento, os animais foram submetidos ao exame físico, hemograma, exame coproparasitológico, e broncoscopia. Como critério de inclusão, foram incluídos no estudo os animais que não apresentarem alterações nos exames descritos anteriormente.

Delineamento Experimental

Os 12 animais foram submetidos a inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*⁶ de acordo com BATISTA (2015) e suas amostras de lavado broncoalveolar e de sangue foram coletadas em quatro momentos. A primeira coleta (M1) foi realizada antes da inoculação intratraqueal de *M. haemolytica*. A segunda coleta (M2) foi realizada no momento em que os animais apresentaram manifestações clínicas compatíveis com a pneumonia por *M. haemolytica* após terem sido avaliados pelas funções vitais constituída pelas avaliações da frequência cardíaca e frequência respiratória, temperatura retal, estado de hidratação, avaliação de mucosas e linfonodos e exame físico específico do sistema respiratório.

⁵ ATCC 33396

⁶ ATCC 33396

Em seguida, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos constituídos por seis animais cada. O grupo 1 (G1) alocou os animais tratados apenas com o antimicrobiano (norfloxacino na dose de 5 mg/kg, por sete dias, uma vez ao dia: SID). O grupo 2 (G2), alocou os animais tratados com o antimicrobiano e anti-inflamatório (flunixinina meglumina na dose de 2,2 mg/kg SID por 3 dias). Um dia após o término do tratamento com o antimicrobiano, foi coletada nova amostra (M3) e uma semana depois do final do tratamento com o antimicrobiano foi realizada a última coleta para verificar se realmente houve cura e evitar a recidiva da doença (M4). O delineamento experimental está descrito na figura 3.

Durante os quatro momentos, foram coletadas amostras de sangue destinadas à dosagem de ferro, proteínas de fase aguda, hemograma, e amostras de lavado broncoalveolar destinadas a dosagem de proteínas de fase aguda e citologia.

Figura 3 - Delineamento experimental do estudo.

Exame Clínico

Os animais foram avaliados diariamente pelas seguintes avaliações: funções vitais (frequências respiratória, frequência cardíaca e temperatura corporal), estado de hidratação e avaliação das mucosas aparentes e linfonodos superficiais.

Em seguida, o exame específico do sistema respiratório foi realizado conforme GONÇALVES e FEITOSA, 2008.

A inspeção indireta foi realizada por meio da endoscopia, de acordo com BATISTA et al. (2012). Essa técnica permite a visualização das vias aéreas passando pelas fossas nasais, traqueia e brônquios, permitindo análise de mucosas, parede do trato respiratório, identificação da presença ou não de muco, hemoptise, aspiração de corpo estranho, além de possibilitar a coleta de material para exame citológico.

Coleta de Sangue e de Lavado Broncoalveolar

Em cada momento foram coletadas duas amostras de sangue de cada bezerro, a primeira em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro e acondicionadas à temperatura de -80°C para as dosagens das proteínas de fase aguda. A segunda em tubo com EDTA dipotássico para realização de hemograma.

O lavado broncoalveolar foi obtido por meio de broncoscopia de acordo com BATISTA et al. (2012). No material coletado, foram dosadas proteínas de fase aguda e confeccionadas lâminas de microscopia por citocentrifugação do lavado para a contagem diferencial.

Concentração do Lavado Broncoalveolar

Para realizar a concentração das amostras de lavado broncoalveolar foi utilizado o equipamento de vácuo⁷ por pelo menos quatro horas a 45°C. Após isso, as amostras foram submetidas a dosagem de concentração de proteína total por meio de refratômetro.

Eletroforese SDS-PAGE

A realização da técnica foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de São Paulo – FCAV-UNESP; localizada em Araçatuba – SP.

⁷ Vacufuge vaccum concentrator - Eppendorf®

Para o fracionamento das proteínas séricas foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme proposto por LAEMMLI (1970).

A cuba⁸ vertical foi utilizada para a corrida em um sistema com diferentes concentrações ligadas a uma fonte de energia⁹.

As proteínas das amostras de soro e lavado broncoalveolar foram desnaturadas na presença de 2-mercaptoetanol e do detergente dodecil sulfato de sódio. Com as amostras no gel, a corrida se iniciava com 20mA até transpassar o gel de separação; a partir de então, aumentou-se 25% do valor da amperagem quando as amostras atingiram o limite do gel de corrida.

Após essa etapa de separação, os géis foram corados por duas horas com uma solução à base de *Coomassie Blue* 0,2%¹⁰, metanol, ácido acético glacial e água deionizada, e foram alocados em um agitador horizontal¹¹.

Em seguida, fez-se o processo de descoloração, que teve duração de 12 horas numa solução já utilizada à base de metanol e ácido acético glacial, até a coloração do gel atingir um tom de azul bem fraco. Os géis foram alocados em refratárias de vidro recobertos por água deionizada.

A captação da imagem do gel foi realizada por meio do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000¹², e as proteínas foram identificadas com auxílio de referência o peso molecular de 6.500 a 20.000 daltons¹³ com o programa ImageQuant TL¹⁴.

Dosagem de uréia

Foram utilizadas 400µl de amostras de soro e lavado broncoalveolar, dos *eppendorfs* que estavam armazenados a -80°C, para a dosagem de ureia. A mensuração foi feita com a ajuda do equipamento RANDOX¹⁵.

⁸ Cuba SE 600 Ruby®, Amersham Biosciences-GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP

⁹ Power Pac 1000, Bio-Rad, UK

¹⁰ Brilliant Blue R - Sigma Aldrich Química Brasil, Jurubatuba, São Paulo, Brasil

¹¹ Agitador horizontal EL 445, Grupo Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP.

¹² GE Healthcare Brasil, Barueri, São Paulo, Brasil.

¹³ SigmaMaker, wide range-Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.

¹⁴ GE Healthcare Brasil, Barueri, São Paulo, Brasil.

¹⁵ [Randox RX Daytona Chemistry Analyzer](#)

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, sendo os grupos 1 e 2 as parcelas e os momentos, as sub-parcelas.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa *Statistical Analysis System*¹⁶. Para verificar a distribuição das variáveis, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de *Shapiko Wilk*, considerando significância de 5%. Foi efetuada a análise de variância simples com comparação entre médias através do teste de LSD, sendo considerado significativo $p < 0.05$.

¹⁶ SAS 9.4, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de eletroforese em SDS-Page está descrito através das Figura 4,5 e 6 seguir.

Figura 4 – Descrição do processamento da eletroforese em SDS-PAGE.

A:Montagem da placa com o gel. B:Fixação do pente no gel. C:Procedimento da corrida de eletroforese. D: Coloração do gel. E: Leitura do gel. F: Armazenagem do gel.

Figura 5 - Foto do gel de eletroforese

Figura 6 – Análise gráfica do gel de eletroforese de um animal submetido a inoculação intratraqueal de *Mannheimia haemolytica*.

Os resultados da eletroforese de proteínas no soro estão descritas nas tabelas e gráficos a seguir.

Tabela 5- Expressão da haptoglobina sérica em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

HAPTOGLOBINA				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	5.4	5.58	22.8	17.7
A2	7.04	3.78	21.83	18.91
A3	4.06	2.4	25.65	12.35
A4	3.92	5.13	38.19	23.79
A5	4.88	19.47	24.18	14.26
A6	11.25	22.01	30.53	67.62
Média	6.091667	9.7283333	27.196667	25.771667
Desvio Padrão	2.767601	8.6392116	6.190133	20.881111
Mediana	5.14	5.355	24.915	18.305

Gráfico 1 – Demonstração gráfica da haptoglobina sérica em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina megluminal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Tabela 6- Expressão da haptoglobina sérica em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroide em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

HAPTOGLOBINA				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	5.4	5.8	11.4	11.76
A2	4.44	11.34	26.46	44.22
A3	4.56	4.55	16.38	30.8
A4	1.8	14.85	42.35	27
A5	6.93	12.96	19.2	18.6
A6	0.62	13.42	12.39	21.7
Média	3.9583333	10.486667	21.3633333	25.68
Desvio Padrão	2.336925	4.282465	11.625133	11.23763
Mediana	4.5	12.15	17.79	24.35

Gráfico 2 - Demonstração gráfica da haptoglobina sérica em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

A haptoglobina apresentou diferença entre os diferentes tempos durante a infecção, porém não obteve diferença estatística entre os grupos tratados com antibiótico mais anti-inflamatório versus o grupo tratado somente com o antibiótico.

Tabela 7- Diferença estatística haptoglobina

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	506,02	526,14	516,08	36,954	0,790
M2	469,37	396,87	433,12	11,339	0,0079
M3	539,08	531,26	535,17	22,801	0,8671
M4	586,16	611,78	589,97	32,679	0,517
Media	520,66	516,51			
Tempo	0,0007		Tempo*Trat	0,191	
AICC	488,4		Matriz	Heterogeneous Toeplitz	

Tabela 8- Expressão da glicoproteína em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezeros.

$\alpha 1$ GLICOPROTEÍNA (AGP)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	10.8	13.02	114.57	35.99
A2	21.12	12.6	125.67	45.14
A3	6.96	11.4	103.17	69.55
A4	12.88	5.13	117.42	51.85
A5	10.98	95.58	79.98	96.1
A6	15	50.41	156.2	150.42
Média	12.95667	31.356667	116.16833	74.841667
Desvio Padrão	4.802906	35.388751	25.201149	42.690188
Mediana	11.93	12.81	115.995	60.7

Gráfico 3 – Demonstração gráfica da glicoproteína em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezeros

Tabela 9- Expressão da glicoproteína em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroide em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezeros.

$\alpha 1$ GLICOPROTEÍNA (AGP)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	21	10.44	27	36.4
A2	17.76	6.3	102.69	73.92
A3	20.52	7.8	84.42	77
A4	15	31.35	146.85	105
A5	6.93	49.68	130.8	70.8
A6	9.92	51.24	59	73.16
Média	15.18833	26.135	91.793333	72.713333
Desvio Padrão	5.741193	20.917728	44.720105	21.839317
Mediana	16.38	20.895	93.555	73.54

Gráfico 4 – Demonstração gráfica da glicoproteína em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Com relação a glicoproteína acida, não houveram diferenças estatísticas entre os grupos tratados com e sem anti-inflamatório, porém ao longo dos diferentes tempos a diferença foi evidente.

Tabela 10- Diferença estatística glicoproteína

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	1,905	1,474	1,690	0,1474	0,153
M2	2,106	2,368	2,237	0,147	0,380
M3	3,321	3,009	3,165	0,147	0,297
M4	3,112	3,207	3,160	0,147	0,748
Media	2,611	2,515			
Tempo	<0,0001		Tempo*Trat	0,2037	
AICC	75,6		Matriz	Compound Symetry	

Tabela 11- Expressão da ceruloplasmina em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

CERULOPLASMINA				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	63.6	61.38	63.27	25.96
A2	27.52	40.95	73.16	23.79
A3	58.58	63	97.47	18.85
A4	54.32	23.94	63.27	208.01
A5	31.11	60.77	52.7	29.14
A6	53.25	41.89	46.86	97.29
Média	48.06333	48.655	66.121667	67.173333
Desvio Padrão	15.01652	15.687201	17.886716	74.972411
Mediana	53.785	51.33	63.27	27.55

Gráfico 5 – Demonstração gráfica da ceruloplasmina em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

Tabela 12- Expressão da ceruloplasmina em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroide em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

CERULOPLASMINA				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	54	34.8	28.8	11.2
A2	70.3	32.76	28.98	54.78
A3	25.08	23.4	24.57	28.7
A4	67.8	53.9	70.95	21
A5	26.46	28.08	46.2	42.6
A6	31.62	39.04	38.35	91.76
Média	45.87667	35.33	39.641667	41.673333
Desvio Padrão	20.76478	10.586616	17.223588	29.002192
Mediana	42.81	33.78	33.665	35.65

Gráfico 6 – Demonstração gráfica da ceruloplasmina em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

Em relação à ceruloplasmina houve diferença estatística no momento 3 (uma semana após tratamento), o grupo que foi tratado com o anti-inflamatório obteve um valor numérico maior que o grupo não tratado com anti-inflamatório. No momento 4 os valores dos animais tratados se mantiveram maiores em relação ao outro grupo, porém sem diferença estatística.

Tabela 13- Diferença estatística ceruloplasmina

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	48,063	45,876	46,970	4,976	0,830
M2	48,655	35,330	41,992	3,765	0,107
M3	66,121	39,641	52,881	4,839	0,021
M4	67,173	41,673	54,423	15,759	0,437
Media	57,503	40,630			
Tempo	0,186		Tempo*Trat	0,366	
AICC	383,5		Matriz	Factor Analytic – FA (1)	

Tabela 14- Expressão da transferrina em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

TRANSFERRINA (TR)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	558	536.3	477.09	519.2
A2	596.48	514.71	412.41	475.8
A3	518.52	458.4	426.36	583.05
A4	492.24	388.74	452.58	523.38
A5	531.92	372.88	442.06	554.9
A6	556.5	732.01	525.4	460.92
Média	542.2767	500.50667	455.98333	519.54167
Desvio Padrão	36.22937	130.86636	40.609812	46.148029
Mediana	544.21	486.555	447.32	521.29

Gráfico 7 – Demonstração gráfica da transferrina em diferentes tempos em animais flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Tabela 15- Expressão da transferrina em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroide em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

TRANSFERRINA (TR)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	562.2	399.62	457.2	448.56
A2	697.08	492.03	435.33	428.34
A3	534.66	586.3	548.1	609.7
A4	516	422.95	424.6	578.4
A5	504	570.96	466.8	547.2
A6	437.72	531.31	364.62	393.7
Média	541.9433	500.52833	449.44167	500.98333
Desvio Padrão	86.60949	76.86094	60.176296	88.863499

Mediana	525.33	511.67	446.265	497.88
----------------	--------	--------	---------	--------

Gráfico 8 – Demonstração gráfica da transferrina em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerras

A transferrina não apresentou diferença estatística entre os dois grupos estudados, mas apresentou diferença estatística entre os momentos.

Tabela 16- Diferença estatística transferrina

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	542,28	541,94	542,11	22,160	0,994
M2	500,51	500,53	500,52	22,160	0,999
M3	455,98	449,44	452,71	22,160	0,883
M4	519,54	500,98	510,26	22,160	0,677
Media	504,58	498,22			
Tempo	0,052		Tempo*Trat	0,989	
AICC	477,2		Matriz	Variance Components	

Lavado Broncoalveolar

Tabela 17- Expressão da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

TRANSFERRINA (TR)				
Animal	T1	T2	T3	T4
A1	12569.040	4698.102	2835.000	10883.438
A2	21038.464	12730.960	24178.286	5682.071
A3	3970.560	6525.788	10940.531	7604.253
A4	2171.813	9139.200	0.000	14235.000
A5	8706.880	12675.921	5268.114	6981.825
A6	11017.917	6130.700	15238.044	3392.640
Média	9912.446	8650.112	9743.329	8129.871
Desvio Padrão	6763.795	3451.905	8974.165	3869.938
Mediana	9862.398	7832.494	8104.323	7293.039

Gráfico 9 – Demonstração gráfica da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Tabela 18- Expressão da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

TRANSFERRINA (TR)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	10506.000	2068.459	13185.818	3958.071
A2	9963.943	13869.450	14526.000	15678.409
A3	244.679	31417.875	0.000	24148.453
A4	2678.974	6927.581	5935.333	3458.280
A5	108618.000	7183.846	13472.550	9608.824
A6	10917.818	19770.025	36621.910	42080.629
Média	23821.569	13539.539	13956.935	16488.778
Desvio Padrão	41783.152	10716.914	12441.835	14754.094
Mediana	10234.971	10526.648	13329.184	12643.616

Gráfico 10 – Demonstração gráfica da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

No lavado broncoalveolar, a transferrina não apresentou diferença entre os dois grupos estudados, entretanto em relação aos momentos a diferença estatística foi encontrada.

Tabela 19- Diferença estatística transferrina

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	180,87	212,61	196,74	33,968	0,642
M2	287,80	250,82	269,31	33,968	0,589
M3	231,74	242,62	237,18	33,968	0,873
M4	380,10	374,10	377,10	33,968	0,930
Media	270,13	270,04			
Tempo	0,004		Tempo*Trat	0,907	
AICC	511,4		Matriz	Variance Components	

conclusão **Tabela 20-** Expressão da albumina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados flunixinina megluminal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

ALBUMINA				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	66.003	13.640	12.531	49.360
A2	113.229	56.321	101.249	36.210
A3	18.255	51.762	47.816	35.987
A4	19.989	38.901	188.611	71.097
A5	48.566	15.822	27.719	40.357
A6	34.462	27.957	94.778	25.780
Média	50.084	34.067	78.784	43.132
Desvio Padrão	35.793	17.995	64.465	15.675
Mediana	41.514	33.429	71.297	38.284

Gráfico 11 – Demonstração gráfica da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados flunixinina megluminal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Tabela 21- Expressão da albumina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

ALBUMINA				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	40.426	10.223	63.574	35.690
A2	79.314	52.496	23.706	71.579
A3	1.838	78.398	52.353	82.835
A4	19.804	32.923	62.273	13.082
A5	303.236	34.967	77.224	46.411
A6	56.769	58.452	142.436	92.050
Média	83.564	44.577	70.261	56.941
Desvio Padrão	110.993	23.696	39.634	30.343
Mediana	48.597	43.732	62.923	58.995

Gráfico 12 – Demonstração gráfica da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

A albumina apresentou diferença no momento 4 entre os grupos, tratamento com anti-inflamatório foi maior, nos outros houve diferença do tempo mas não teve entre os grupos.

Tabela 22- Diferença estatística albumina

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	0,932	1,104	1,018	0,092	0,376
M2	0,973	0,982	0,978	0,083	0,960
M3	1,703	1,438	1,570	0,223	0,567
M4	2,085	1,532	1,808	0,076	0,004
Media	1,423	1,264			
Tempo	<0,0001		Tempo*Trat	0,0373	
AICC	57,7		Matriz	Banded	

Tabela 23- Expressão da glicoproteína no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

α1 GLICOPROTEÍNA (AGP)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	5464.800	2719.954	980.910	3019.575
A2	4890.021	13884.127	10383.543	0.000
A3	2772.480	5453.475	14233.313	0.000
A4	987.188	3605.700	0.000	4095.000
A5	7239.960	3034.093	1094.971	0.000
A6	5683.333	3151.200	10702.206	0.000
Média	4506.297	5308.091	6232.490	1185.763
Desvio Padrão	2250.091	4312.525	6229.605	1868.190
Mediana	5177.411	3378.450	5739.257	0.000

Gráfico 13 – Demonstração gráfica da transferrina no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados com flunixinina meglumina em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Tabela 24- Expressão da glicoproteína no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros.

α1 GLICOPROTEÍNA (AGP)				
Animal	M1	M2	M3	M4
A1	7361.000	1521.563	4877.455	3772.800
A2	776.657	7415.910	2970.000	0.000
A3	776.107	14518.125	0.000	0.000
A4	1457.860	3643.145	0.000	5575.200
A5	39646.000	1662.692	4459.445	3267.000
A6	6264.000	13010.125	1196.290	0.000
Média	9380.271	6961.927	2250.532	2102.500
Desvio Padrão	15103.783	5702.222	2169.741	2427.638
Mediana	3860.930	5529.528	2083.145	1633.500

Gráfico 14 – Demonstração gráfica da glicoproteína no lavado broncoalveolar em diferentes tempos em animais tratados sem anti-inflamatório não esteroidal em uma infecção experimental de *Mannheimia haemolytica* em bezerros

Não teve diferença estatística entre os grupos, porém no momento 3 houve uma tendência, tratamento A maior. Teve diferença entre os momentos.

Tabela 25- Diferença estatística glicoproteína

Variável	Tratamento		Media	EPM	Prob (p)
	A	B			
M1	99,761	190,71	145,24	23,824	0,065
M2	158,52	188,56	173,54	23,824	0,532
M3	138,64	47,943	93,289	23,824	0,065
M4	64,380	15,583	39,981	23,824	0,313
Media	115,32	110,70			
Tempo	0,0010		Tempo*Trat	0,0312	
AICC	481,3		Matriz	Banded Toeplitz	

A manheimiose continua a ser uma das doenças do CDRB mais importante na indústria de confinamento em todo o mundo. Aproximadamente 16% da população bovina entrante desenvolve DRB durante o período de confinamento. Comumente, os funcionários treinados observam o gado e decidem o tratamento, se necessário. No entanto, o diagnóstico impreciso e tardio contribui para as perdas econômicas associadas a esta importante doença (CERÓN et al., 2005).

A fim de se evitar tais perdas o diagnóstico precoce na produção tem sido priorizado, sendo assim, as proteínas de fase aguda tem sido adotadas como um dos mecanismos de detecção para as doenças respiratórias.

A Hp por exemplo, é um marcador de infecção bacteriana e segundo CERÓN et al. (2005), pode ser detectada na circulação 24 horas após o trauma e suas concentrações chegam ao pico máximo em quatro dias. Suas funções são descritas como ligante de hemoglobina, agente bacteriostático e fator estimulador de angiogênese, participa no metabolismo de lipídios e possui importante efeito imunomodulador. Segundo ALMEIDA, (2006) a Hp liga-se à hemoglobina liberada por eritrocitos danificados e junto com a hemopexina e a transferrina, ajuda a diminuir os efeitos deletérios do ferro livre, ou seja, restringe a disponibilidade do ferro livre para a multiplicação de bactéria invasora.

Hp é frequentemente investigada em bovinos e mostrou aumento de concentrações séricas após infecção bacteriana e viral respiratória (CONNER et al., 1989; HEEGAARD et al., 2000; SCHROEDL et al., 2001). As concentrações de Hp também mostraram aumentar na glândula mamária (WHELEHAN et al., 2011) e no líquido broncoalveolar (BOEHMER et al., 2011) após infecção local. Hp já foi detectada no lavado broncoalveolar de bezerros inoculados com *Pasteurella haemolytica* (KATOH et al., 1999).

Visto isso, o trabalho corrobora com CONNER et al., (1989); HEEGAARD et al., (2000); SCHROEDL et al., (2001) e CERON et al. (2005); já que houve diferença estatística entre os tempos mostrando a atuação da Hp durante a infecção bacteriana, entretanto apresentou diferença estatística entre os grupos de anti-inflamatório devido ao fato dela não estar ligada à inflamação e sim a infecção. Em contraste com os resultados de PROHL et al., (2015), conseguimos confirmar o aumento local das concentrações de Hp no pulmão.

A glicoproteína ácida (AGP) é uma importante PFA em bovinos e tem sido utilizada como importante monitor do processo inflamatório (CONNER et al., 1989; ECKERSALL et al., 2001; MURATA et al., 2004). Aumento sérico de AGP já foi observado em porcos com doenças infecciosas como pneumonia ou meningite (ITOH et al., 1993). No presente estudo, em relação a AGP não foi encontrado nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados com ou sem AINE tanto no lavado broncoalveolar quanto no soro dos animais, porém pudemos observar que no soro os valores aumentaram do M1-M4. Em relação ao lavado broncoalveolar encontramos uma tendência estatística no M3, onde o grupo tratado com AINE apresentou um número mais elevado dessa proteína. No momento 4 esse padrão se manteve, onde os animais tratados com AINE mantiveram uma concentração mais elevada dessa PFA no lavado broncoalveolar.

A transferrina é considerada a principal parte da fração de β -globulina no gado, além de ser uma PFA negativa que está envolvida com a imunidade inata (MURATA et al., 2004). Durante o experimento a transferrina não apresentou diferença estatística nem em relação aos grupo e nem em relação ao tempo no que diz respeito ao soro dos animais. Em contraste, no lavado broncoalveolar a concentração de transferrina cai no M3 proporcionalmente entre os grupos com e sem AINE e volta a subir a concentração no M4; corroborando com MURATA et al. (2004) que diz que em bovinos com infecção aguda, os valores diminuem.

A albumina se mostrou diferente entre os grupos no momento 4 do lavado broncoalveolar. O grupo tratado com AINE apresentou valores maiores em relação ao não tratado. Ao longo dos tempos ela foi aumentando sua concentração independente do tratamento utilizado.

A ceruloplasmina apresentou diferença no momento 3 no soro dos animais tratados com AINE, permanecendo em maiores concentrações. Em relação ao M4, ela apresentou o mesmo padrão porém sem diferença estatística.

Pesquisas demonstraram que PFA são marcadores clínicos de severidade de pneumonia (ACKERMANN et al., 2010), corroborando com o estudo.

O amilóide sérico, haptoglobina, glicoproteína e ceruloplasmina, são produzidas pelo fígado em resposta a infecção pela *M. haemolytica* durante pneumonia.

5.5 CONCLUSÃO

As proteínas de fase aguda são marcadores precoces de inflamação aguda, há diferença nas concentrações de haptoglobina, albumina e transferrina em animais com broncopneumonia induzida por *Mannheimia haemolytica*.

No modelo empregado, a haptoglobina sérica se mostrou mais precoce frente a infecção, não apresentando o mesmo perfil no lavado broncoalveolar. Entretanto a transferrina se mostrou eficaz para a resposta local, e sua evolução no lavado broncoalveolar acompanha a evolução do tratamento em relação a resposta inflamatória local.

4.4 REFERÊNCIAS

Boehmer JL, Degrasse JA, Lancaster VA, McFarland MA, Callahan JH, Ward JL. Evaluation of protein expression in bovine bronchoalveolar fluid following challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Proteomics*. 2011;11(18):3685–97. doi:10.1002/pmic.201000710.

CECILIANI, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. The systemic reaction during inflammation: the acute phase proteins. *Protein & Peptide Letters*, v.9, p. 211– 223, 2002.

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*. v 75, p. 4207-4231, 2012.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, Santa Barbara, v. 34, p. 85-99, 2005.

Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Bain RK, Douglas TA. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi*

ECKERSALL, D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. New York: Elsevier, 2008, p.117-155.

EDINGER, V.H.; MILLER, I.; STANEK, C. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horses. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* v.99, p.426-430, 1992

GÅNHEIM, C.; HULTÉN, C.; CARLSSON, U.; KINDAHL, H., NISKANEN, R.; WALLER, K.P. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. v. 50, n.4, p. 183-190, 2003.

GORDON, A.H. *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*. New York: Elsever, 1995, p.213

HEEGAARD PM, GODSON DL, TOUSSAINT MJ, TJORNEHOJ K, LARSEN LE, VIUFF B, The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;77(1–2):151–9.

HULTÉN, C.; SANDGREN, B.; SKIÖLDEBRAND, E.; KLINGEBOR, B.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand*. v. 40, n. 4, p. 323-333, 1999.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, New Delhi, v. 3, p.118-127, 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 7. ed. San Diego: Academic Press, 2008. 912 p.

KATOH N, MIYAMOTO T, NAKAGAWA H, WATANABE A. Detection of annexin I and IV and haptoglobin in bronchoalveolar lavage fluid from calves experimentally inoculated with *Pasteurella haemolytica*. Am J Vet Res. 1999;60(11):1390–5.

LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

MATTEWS, A.G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. Equine Veterinary Journal, v.14, p.322-324, 1982.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase protein in veterinary diagnosis: an overview. The Veterinary Journal, v.168, p28- 40, 2004.

NAOUM, P.C. Eletroforese: técnicas e diagnósticos. São Paulo: Editora Santos, 1990. 174p.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T. C.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D. P.; MARTINS, D. B. Eletroforese: conceitos e aplicações. Enciclopédia Biosfera, 2015.

SCHROEDL W, FUERLL B, REINHOLD P, KRUEGER M, SCHUETT C. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). J Endotoxin Res. 2001;7(1):49–52.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; KOVÁČ, G. The Use of Acute Phase Proteins as Biomarkers of Diseases in Cattle and Swine. In: Janciauskiene S, editor. Acute Phase Proteins. InTech. 2013.

VOLP, A. C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINGUETAI, P. C.; BRESSAN, J. Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. v.52, n.3, 2008.

YUN, C.; WYNN, P.; JONG, K.H.A. Stress, acute phase proteins and immunomodulation in calves. Animal Production Science. v. 54, p. 1561–1568. 2014

WHELEHAN CJ, MEADE KG, ECKERSALL PD, YOUNG FJ, O'FARRELLY C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. Vet Immunol Immunopathol. 2011;140(3–4):181–9. doi:10.1016/j.vetimm.2010.11.013.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Existe fundamentação quanto à manheimiose pneumônica bovina ser importante como viés no cenário mundial da pecuária, devido a perdas financeiramente significativas.

A doença compromete o bem estar dos animais broncopneumônicos.

O anti-inflamatório impacta mais na resposta sistêmica, embora tenha sido observado efeito na resposta inflamatória local, quando empregado em associação ao antimicrobiano.

As proteínas de fase aguda são marcadores precoces de inflamação aguda. Destas, a haptoglobina sérica e a transferrina do lavado broncoalveolar são bons marcadores precoces para a manheimiose pneumônica bovina e respectivo prognóstico.

Isto posto, o emprego do anti-inflamatório é indicado e potencialmente diminui as perdas decorrentes da doença.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. **Innate immunology of Bovine Respiratory Diseases**. Veterinary Clinical Food Animals, v. 26, p. 215-228, 2010.
- AMES, T. R.; BAKER, J. C.; WIKSE, S. E. **As broncopneumonias (Complexo de Doenças Respiratórias de Bovinos, Ovinos e Caprinos)**. Medicina interna de grandes animais. 3º ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 511-570.
- CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. **Acute phase proteins in ruminants**. Journal of Proteomics. v 75, p. 4207-4231, 2012.
- CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. **Respiratory system**. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals. 5ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, p. 540–575, 2007.
- CERÓN JJ., ECKERSALL PD., MARTINEZ-SUBIELA S. **Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives**. Veterinary Clinical Pathology. v. 34, p. 85-99, 2005.
- FAGLIARI, J. J. **Estudo clínico e laboratorial da pneumonia de bezerros induzida pela inoculação intrabronquial de *Mannheimia haemolytica***. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 55, n. 1, p. 8-14, 2003.
- GÅNHEIM, C.; HULTÉN, C.; CARLSSON, U.; KINDAHL, H., NISKANEN, R.; WALLER, K.P. **The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica***. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. v. 50, n.4, p. 183-190, 2003.

GAVA, A. **Pasteurelose em bovinos em confinamento.** Encontro nacional de patologia veterinária. 1999.

GONÇALVES, R. C.; LISBÔA, J. A. N.; SOUSA, M. V.; A. C. T.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; C. S. B. **Aspectos clínicos e epidemiológicos da broncopneumonia dos bezerros em Botucatu, SP.** Revista Brasileira de Ciências Veterinárias. v. 7, p. 144-147, 2000.

GONZÁLEZ, F.H.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.J. **Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas.** Anal. Vet. Mur., v.23, p.5-17, 2007.

GRONLUND, U.; HULTEN, C.; ECKERSALL, P.D.; HOGARTH, C.; WALLER, K.P. **Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis.** Journal Dairy Res, v. 70, n 379, p. 86, 2003.

GULLIKSEN, S. M., JOR, E.; LIE, K. I.; LOKEN, T.; AKERSTEDT, J.; OSTERAS, O. **Respiratory infections in Norwegian dairy calves.** J. Dairy Sci. v. 92, p.5139-5146, 2009.

HANZLICEK, G. A.; WHITE, B. J.; MOSIER, D.; RENTER, D. G.; ANDERSON, D. E. **Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced Mannheimia haemolytica pneumonia in postweaned calves.** American Journal of Veterinary Research, v.71, n.3, p. 359-369, 2010.

HEEGAARD, P. M. H.; GODSON, D.L.; TOUSSAINT, M. J. M.; TJORNEHOJ, K.; LARSEN, L.E.; VIUFF, B.; RONSHOLT L. **The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental**

infection with bovine respiratory syncytial virus. Veterinary Immunology and Immunopathology. v. 77, p.151- 159, 2000.

HEMSWORTH, P. H.; COLEMAN, G.; BARNETT, J. L.; BORG, S. **Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows.** Journal of Sience, Champaign, v.78, p.2821-2831, 2000.

LEKEUX, P. **Síndrome Respiratória dos Bovinos: Uma Perspectiva Européia.** **Simpósio Internacional Sobre Doença Respiratória Bovina.** Congresso Mundial de Buiaria, França, p. 7-13, 1994.

LEVI, M.; POLLT, V.; BULLER, H.R. **Bidirectional relation between inflammation and coagulation.** Circulation. v. 109, n. 22, p. 2698-704. 2004.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; KOVÁČ, G. **The Use of Acute Phase Proteins as Biomarkers of Diseases in Cattle and Swine.** In: Janciauskiene S, editor. Acute Phase Proteins. InTech. 2013.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; KOVÁČ, G. **Acute Phase Proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review.** Veterinarni Medicine, v. 59, n 4, p. 163-180, 2014.