CAMILA COSTA BACCILI

Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1

São Paulo

2017

CAMILA COSTA BACCILI

**Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da
injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para
BVDV e BoHV-1**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Viviani Gomes

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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. 3584
FMVZ

Baccili, Camila Costa

Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1 / Camila Costa Baccili. – 2017.

145 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Viviani Gomes.

1. Vacinação. 2. Adjuvantes. 3. Efeitos adversos. 4. Imunidade inata. 5. Imunidade adaptativa. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1", protocolada sob o CEUA nº 6229201216, sob a responsabilidade de **Viviani Gomes e equipe; Camila Costa Baccili** - 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 15/03/2017.

We certify that the proposal "Adjuvants in reproductive vaccines: adverse effects, temperature at the site of injection, inflammatory response and production of neutralizing antibodies for BVDV e BoHV-1", utilizing 35 Bovines (35 females), protocol number CEUA 6229201216, under the responsibility of **Viviani Gomes and team; Camila Costa Baccili** - 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 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 12/2016 a 12/2017 Área: Clínica Médica Veterinária

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Bovinos sexo: Fêmeas idade: 15 a 24 meses N: 35 Linhagem: Holandesas/HPB Peso: 200 a 400 kg

Resumo: O objetivo geral desta pesquisa será avaliar os efeitos adversos, resposta inflamatória e produção de anticorpos induzida por três vacinas comerciais reprodutivas contendo diferentes tipos de adjuvantes: hidróxido de alumínio, composto oleoso e uma mistura contendo saponina Quil A, colesterol e amphigen. Para tanto serão utilizadas 35 fêmeas bovinas distribuídas em quatro grupos experimentais: Grupo 1 – vacinados com produto contendo hidróxido de alumínio como adjuvante (n=10); Grupo 2 vacinados com produto contendo adjuvante oleoso (n=9); Grupo 3- vacinados com produto contendo uma mistura contendo saponina Quil A, colesterol e amphigen (n=10); Grupo 4- controle não vacinado (n=6) que receberão 5mL de solução salina. As reações adversas locais e sistêmicas, assim como a resposta inflamatória das novilhas serão avaliadas nos seguintes momentos antes (0h) e pós-vacinais: 6, 24, 48, 72 e 168 horas. A produção de anticorpos específicos para o BVDV e BoHV-1 serão determinados na vacinação (D0), no dia do reforço (D21) e 21 dias após a segunda dose da vacina. Serão colhidas amostras de sangue total com EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic acid) a 7,4 mg para realização do leucograma e produção das espécies reativas de oxigênio; e em tubos sem anticoagulante para titulação de ACs específicos e dosagem de haptoglobina..

Local do experimento: Colheita de amostras: Fazenda Palmeira - Instituto de Zootecnia (IZ) Realização de análises: Laboratório de Pesquisa FMVZ/USP -Departamento de Clínica Médica

São Paulo, 17 de março de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
Universidade de São Paulo de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BACCILI, Camila Costa

Título: Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para o BVDV E BoHV-1

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que sempre iluminou meu caminho e guiou meus passos, sempre estarei ao lado do Espírito Santo e assim nunca me sentirei só.

À toda minha família amada, vocês são minha fonte de inspiração.

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Viviani Gomes, por toda sua dedicação, paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por acordar todos os dias, abrir meus olhos, respirar, caminhar e ir à luta!

À minha família por sempre estarem ao meu lado e sendo anjos em meu caminho. Algo muito forte nos une e eu tenho certeza que não é apenas o sangue, mas sim o amor e a afinidade de almas! Pai, mãe, Edu e Vini amo vocês para todo sempre!

Ao meu marido e companheiro Maurício que em nenhum momento me desamparou e mesmo nos dias mais difíceis me aliviou com seu lindo sorriso e amor. Aos meus filhos de estimação Manah, Chilli, Petruquio e Catarina por sempre me olharem da forma mais pura e sincera. Amo muito vocês minha família!

À minha orientadora, Profa. Dra. Viviani Gomes por todo companheirismo desta trajetória! Você sempre acreditou e confiou em meu trabalho, me mostrando como eu era capaz, serei eternamente grata! Sempre desejei não ser apenas mais uma tese em sua estante, espero que nosso convívio tenha marcado não apenas sua história na Universidade, mas também tenha feito diferença em sua vida, que eu possa sempre ser lembrada com muito carinho. Tenho certeza que nossa parceria ira se perpetuar por muito tempo. Agradeço a Deus por nosso encontro, muito obrigada por tudo sempre!

Aos meus amigos, muito obrigada pelas conversas, indagações, questionamentos e claro muito carinho e compreensão. Obrigada à todos!

Ao ilustre diretor da FMVZ/USP Prof. Dr. José Antonio Visintin e aos admirados professores do Departamento de Clínica Médica: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Profa. Dra. Carla Bargi Belli, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Profa. Dra. Denise Saretta Schwartz, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Lílian Gregory, Profa. Dra. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Raquel Yvona

Arantes Baccarin, Profa. Dra. Silvia Regina Ricci, Profa. Dra. Viviani Gomes e Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.

Aos companheiros da equipe GeCRIA: Camila Martin muito obrigada por toda ajuda em meu experimento desde as madrugadas mais chuvosas até as risadas mais sinceras, você foi uma grande companheira em toda minha caminhada. Natália Sobreira sempre muito atenciosa e preocupada com todos, muito obrigada. Jean sempre muito intenso e sincero, vou sentir falta das nossas conversas, idéias e planos, você trouxe muita inspiração para toda equipe, muito obrigada pela sua amizade. Karen Nascimento chegou de mansinho e conquistou todos nós com sua força e dedicação, você vai longe. Agradeço toda consideração e amizade! Nathália Decaris muito obrigada pela ajuda na fazenda e inúmeras vezes no laboratório. Fabrício mesmo longe sempre muito presente, nos ajudou e cedeu as análises de ELISA, e sempre enriqueceu muito as discussões sobre nosso querido BVD, muito obrigada. Raquel sempre espontânea e sempre pronta a ajudar, muito obrigada! Dani você é nossa chilena preferida, seu destino era estar em nossa equipe, até parece que nos conhecemos há anos! Profa. Dra. Karina Medici Madureira muito obrigada pela parceria com a equipe GeCria, você sempre terá um espaço garantido em meu coração. Equipe muito obrigada por sempre terem demonstrado apoio, carinho e amizade, serei sempre grata por viver quatro anos ao lado de pessoas tão maravilhosas.

Aos membros da equipe que, mesmo já tendo saído tiveram participação em minha trajetória: Cynthia Pereira da Costa e Silva, Vinicius Alvim Passos Baldacim, Sylvia Marquart Fontes Novo, Bruno Toledo Silva, Juliana Reis muito obrigada por cada experiência que vivemos!

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação Carol Shecaira, Carol Japa, Ju Bombardelli, Elisa, Rejane Souza, Leonardo Barreira, Mailson, Nathália Minami, Fábio Sella, Ronaldo Gargano, Bruna, Carol dos Anjos, Kamila Reis, Rodrigo Malzoni, Jesyca e Fernando Nogueira, desejo muito sucesso e boa sorte à todos!

À toda equipe dos Laboratórios da FMVZ/USP, Clara Mori, Cláudia, Maria Helena da Silva. À Dinha por tornar o ambiente mais alegre e engraçado, nossas conversas ficarão sempre guardadas na memória! Obrigada!

Meus sinceros agradecimentos para a equipe do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, em especial Marina e Diego. Muito obrigada por toda troca de conhecimento que foi dado à equipe GeCRIA. Mari sua presença será um lindo presente da vida!!

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial Maristela Pituco e Cláudia Pestana. Muito obrigada por todos ensinamentos e prontidão a nos atender.

Gostaria de agradecer a toda a equipe do Instituto de Zootecnia (IZ) Gado de leite que sempre nos abriram as portas para que nossos experimentos pudessem ser realizados. Muito Obrigada Claudia Pozzi, Mariana, Anibal e Luciandra.

Aos residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) de 2014 a 2017. Todos vocês sempre nos ajudaram prontamente em algum momento! Muito obrigada e desejo muito sucesso para vocês!

À toda equipe do Prof. Marcílio Nichi do Departamento de Reprodução Animal que prontamente me ensinaram estatística e sempre esclarecendo todas dúvidas com muito carinho. Muito obrigada!

À toda equipe da Zoetis que apoiam nossos trabalhos desde o mestrado até os dias de hoje. Muito obrigada Elio Moro e Andressa Raniere.

À todos funcionários da FMVZ/USP meus sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das minhas bolsas de mestrado e doutorado (2012-2017).

.

“If you want to go fast, go alone. If you want go far, go together”

African Proverb

RESUMO

BACCILI, C. C. **Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1.** [Adjuvants in reproductive vaccines: adverse effects, temperature at the site of injection, inflammatory response and production of neutralizing antibodies for BVDV e BoHV-1]. 2017. 145f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Novilhas Holandesas (n=35) foram vacinadas e distribuídas em grupos de acordo com os adjuvantes presentes nas vacinas comerciais contra BVDV e BoHV-1: Halum (hidróxido de alumínio, n=9), Oleosa (emulsão oleosa, n=10), Prezent A (composto saponina, n=10) e Salina (controle, n=6). As reações locais e sistêmicas foram avaliadas às zero horas (h), seis, 24, 48, 72 e 168h pós-vacinal. A produção de anticorpos (ACs) foi mensurada nos dias da vacinação (D0), D21 e D42. **Capítulo 1** – O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória sistêmica em novilhas vacinadas contendo diferentes tipos de adjuvantes. O número de hemácias (P=0,009) e hemoglobina (P=0,028) foram maiores no grupo Prezent A após a 2ª dose. Os teores de ferro foram maiores no grupo controle após 1ª e 2ª dose (P=0,000; 0,000). Em geral, no leucograma os grupos vacinados apresentaram decréscimo nos números de leucócitos (P=0,001) em 2ª dose, neutrófilos (%) (P=0,000; 0,000) em ambas aplicações e monócitos (%) (P=0,010) após 1ª dose. Os linfócitos (%) apresentaram aumento gradual após as duas doses (P=0,031; 0,000), observando-se menores proporções nos grupos Prezent A e Oleosa. Basófilos (%) após 2ª dose (P=0,012) e eosinófilos (%) (P=0,000; 0,000) foram mais reativos nos grupos Prezent A e Halum entre 24 e 72h. As novilhas Prezent A apresentaram maiores valores (P=0,000; 0,000) haptoglobina às 24 e 48h em relação aos demais grupos após a 1ª e 2ª dose. Em geral, a produção de EROs foi suprimida nas novilhas vacinadas em relação ao controle após 1ª dose (P=0,018) e entre 24 à 168h após a 2ª dose (P=0,002). **Capítulo 2** – O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos adversos associados às reações locais e sistêmicas, assim como verificar a reposta imune humoral induzida pelas vacinas. A reatividade local foi mais intensa no grupo Oleosa após a 1ª dose (P=0,000), em contrapartida o grupo Prezent A após a 2ª dose foi mais reativo (P=0,000). A temperatura retal foi elevada em Prezent A entre 0 a 24h em 1ª dose (P=0,000). O escore de Doença Respiratória Bovina foi mais intensa no grupo Prezent A e Oleosa

às 48 horas ($P=0,0024$). Os ACs contra BVDV foram detectados apenas em D42, observando-se médias semelhantes entre Prezent A ($\log_2=5$) e Halum ($\log_2=5$). A soroconversão foi maior em Halum (78%) em comparação ao Prezent A (40%) e oleosa (10%). Em relação ao BoHV-1, observou-se títulos e soroconversão em D21 nos grupos Halum ($\log_2=3$; 67%) e Prezent A ($\log_2=1$; 80%). No D42 verificou-se uma maior intensidade de resposta para Prezent A ($\log_2=6$; 100%), seguido de Halum ($\log_2=4$; 100%) e Oleosa ($\log_2=3,0$; 60%). Os dados permitem concluir que a vacina contendo o adjuvante oleoso e Prezent A ocasionaram maior reatividade local, porém a Prezent A induziu maior resposta inflamatória sistêmica. A produção de ACs contra o BVDV e BoHV-1 foi mais intensa na vacina com hidróxido de alumínio e Prezent A. Estudos futuros são necessários para demonstrar os efeitos benéficos da resposta inflamatória sistêmica do Prezent A sobre a resposta imune adquirida mediada por células do tipo Th1.

Palavras-chave: Vacinação. Adjuvantes. Efeitos adversos. Imunidade Inata.
Imunidade adaptativa.

ABSTRACT

BACCILI, C. C. **Adjuvants in reproductive vaccines: adverse effects, temperature at the site of injection, inflammatory response and production of neutralizing antibodies for BVDV e BoHV-1.** [Adjuvantes nas vacinas reprodutivas: efeitos adversos, temperatura no sítio da injeção, resposta inflamatória e produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1]. 2017. 145f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Dairy heifers (n=35) were vaccinated and distributed according to adjuvants present in commercial vaccines against BVDV and BoHV-1: Halum (n=9), Oil (n=10), Prezent A (n=10) and Saline (n=6). The local and systemic reactions were evaluated at zero hours (h), 6, 24, 48, 72 and 168h post-vaccination. The production of antibodies (ABs) was measured at vaccination days (D0), D21 and D42. **Chapter 1** – The objective of this study was to evaluate the inflammatory systemic response in vaccinated heifers with products that contained different types of adjuvants. The numbers of red blood cells ($P=0.009$) and hemoglobin ($P=0,028$) were higher in Prezent A after the 2nd dose. The iron were higher in saline group after 1st and 2nd dose ($P=0.000$; 0.000). In leukogram, vaccinated groups showed a decrease in total leukocytes ($P = 0.001$) at 2nd dose, neutrophils (%) ($P = 0.000$; 0.000) in both applications and monocytes (%) ($P = 0.010$) . Lymphocytes (%) presented gradual increase after received two doses ($P = 0.031$; 0.000), showing smaller proportions in Prezent A and Oil groups. Basophils (%) after 2nd dose ($P = 0.012$) and eosinophils (%) ($P = 0.000$; 0.000) were more reactive in Prezent A and Halum groups between 24 and 72h. Prezent A group presented higher values ($P = 0.000$; 0.000) of haptoglobin at 24 and 48h compared to the other groups after the 1st and 2nd doses. In general, ROS production was suppressed in vaccinated heifers relative to control after the 1st dose ($P = 0.018$) and 24 to 168h after the 2nd dose ($P = 0.002$). **Chapter 2** – The objective of this research was to evaluate the adverse effects associated with local and systemic reactions as well measure humoral immune response induced by reproductive vaccines containing different adjuvants. Local reactivity was more intense in Oil group after the 1st dose ($P = 0.000$), in contrast, Prezent A group presented higher reactivity after the 2nd dose. Rectal temperature was higher in Prezent A between 0 and 48 hours in the 1st dose. Bovine Respiratory Disease score was higher in Prezent A and Oil groups at 48h ($P=0.002$). ABs against BVDV were detected only at D42, observing the similar averages between Prezent A ($\log_2=5$) and

Halum ($\log_2=5$). The seroconversion was higher in Halum (78%) compared to Prezent A (40%) and oil (10%). The titers and seroconversion against BoHV-1 at D21 were observed in Halum ($\log_2 = 3$; 67%) and Prezent A ($\log_2 = 1$; 80%) groups. At D42 a higher response was observed for Prezent A ($\log_2 = 6$, 100%), followed by Halum ($\log_2 = 4$, 100%) and Oil ($\log_2 = 3.0$, 60%). The data allow to conclude that the vaccine containing oil adjuvant and Prezent A caused greater local reactivity, but Prezent A induced a greater systemic inflammatory response. The production of ABs against BVDV and BoHV-1 was more intense in Halum vaccine and Prezent A. Future studies are needed to demonstrate the beneficial effects of the systemic inflammatory response of Prezent A on the acquired Th1 cell-mediated immune response.

Keywords: Vaccination. Adjuvants. Adverse effects. Innate immunity. Adaptive immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resposta sistêmica em virtude de resposta inflamatória aguda – São Paulo – 2017.....	31
Figura 2 — Interação das células dendríticas e linfócitos no linfonodo – São Paulo – 2017.....	34
Figura 3 – Esquema de resposta imune induzida pela vacinação – São Paulo – 2017	37
Figura 4 - Aplicação das vacinas na região da tábua do pescoço – São Paulo 2017.....	59
Figura 5 - Pasto (a); curral de espera (b); brete de contenção (c, d) - São Paulo – 2017.....	60
Figura 6 - Diagrama representativo das avaliações – São Paulo – 2017	61
Figura 7 - Fluxo laminar estéril (a); avaliação da viabilidade celular pela prova de exclusão de Azul de Tripan – São Paulo – 2017	64
Figura 8 - Valores médios e desvio padrão em relação as concentrações de He, HGB, Hto e ferro no sangue das novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	70
Figura 9 - Valores médios absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) e desvio padrão em relação aos leucócitos totais, linfócitos e monócitos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	74
Figura 10 - Valores médios absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) e desvio padrão em relação aos basófilos, neutrófilos e eosinófilos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	75
Figura 11 - Valores médios relativos (%) e desvio padrão em relação aos linfócitos, monócitos e basófilos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	76
Figura 12 - Valores médios relativos (%) e desvio padrão em relação aos neutrófilos e eosinófilos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017.....	77
Figura 13 - Valores médios e desvio padrão em relação as concentrações de haptoglobina (mg/dL) de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	79

Figura 14 - Valores médios e desvio padrão em relação a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) de células não estimuladas e células estimuladas com PMA de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	81
Figura 15 - Diagrama representativo das avaliações – São Paulo – 2017	108
Figura 16 - Mensuração da pele em relação à altura (a); largura (b) – São Paulo – 2017	110
Figura 17 - Imagem termográfica com a região pré-determinada no software FLIR antes 0h da vacinação (a); após 24h da aplicação da vacina (b) – São Paulo – 2017	111
Figura 18 - Valores médios e desvio padrão em relação a espessura e temperatura (°C) média da pele no local da injeção de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	119
Figura 19 - Valores médios e desvio padrão em relação a temperatura (°C) retal expressas pelas de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	121
Figura 20 - Frequências (n/%) da soma ≥ 5 de escore DRB em novilhas antes e após receberem as vacinas contendo diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	124
Figura 21 - Valores médios em relação a produção de anticorpos específicos para BVDV e BoHV-1 no soro de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens em relação aos diferentes tipos de vacinas.....	41
Tabela 2 – Valores de “ <i>P</i> ” dos efeitos de tratamento, dia e a interação entre tratamento x dia no eritrograma de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	68
Tabela 3 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação ao eritrograma e concentração de ferro sérico de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	69
Tabela 4 - Valores de “ <i>P</i> ” dos efeitos de tratamento, dia e a interação entre tratamento x dia no leucograma de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	72
Tabela 5 - Valores médios absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) obtidos no leucograma de novilhas Holandesas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017.....	73
Tabela 6 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação a dosagem de haptoglobina (mg/dL) no soro de novilhas de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	78
Tabela 7 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação a produção de espécies reativas de oxigênios (EROS) de células não estimuladas, células estimuladas com PMA e RRTIO de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	80
Tabela 8 - Frequências (n/%) dos escores de sinais cardinais (dor e calor) expresso por novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017.....	117
Tabela 9 - Valores médios em relação a espessura da pele no local da injeção expressos por novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017.....	118
Tabela 10 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) retal expressos por novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	121

Tabela 11 - Frequências (n/%) do escore respiratório, temperatura retal e escore de fezes presentes em novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	123
Tabela 12 - Valores médios de anticorpos específicos para BVDV e BoHV-1 no soro de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017.....	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Constituição dos grupos experimentais de acordo com a composição de cada vacina – São Paulo – 2017	58
Quadro 2 - Preenchimento da placa de 96 poços fundo chato para a mensuração da produção de EROS pelas células sanguíneas de novilhas vacinadas - São Paulo - 2017	65
Quadro 3 - Constituição dos grupos experimentais de acordo com a composição de cada vacina – São Paulo – 2017	107
Quadro 4 - Escores de manifestações clínicas realizados em novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	112
Quadro 5 - Escores de efeitos adversos adotado para detecção de reação sistêmica em novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs	Anticorpos
APC	Células apresentadoras de antígenos
BCR	<i>B Cellular Receptors</i>
BoHV-1	Herpesvírus Bovino tipo -1
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	<i>Efeito citopático</i>
CRP	Proteína C reativa
DC	Células dendríticas
DHR-123	<i>Dihydrorhodamine-123</i>
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRB	Doença Respiratória Bovina
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
ERO'S	Espécies Reativas de Oxigênio
fl	Fentolitro
G	Força G
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
He	Hemácias
HP	Haptoglobina
Hto	Hematócrito
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
L	Litros
Leu	Leucócitos totais

LEUCO	Leucócitos totais
Linf	Linfócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minutos
ml	Militros
MLV	<i>Modified-live virus</i>
mM	Milimol
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NCP	Efeito não-citopático
Neu	Neutrófilos
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Proteínas de fase aguda
pg	Picograma
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
SN	Soroneutralização
TCID	<i>Tissue Culture Infective Doses</i>
TCR	<i>T Cellular Receptors</i>
TEMP	Temperatura

TLR

Toll-Like Receptors

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
=	Igual
±	Mais ou menos
\$	Dólares
n°	Número
≥	Maior ou igual que
°C	Graus Celsius
≤	Menor ou igual que
®	Marca Registrada
-	Menos
+	Mais
*	Diferença estatística
<	Menor que
h	Horas
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 VACINOLOGIA.....	28
2.1.1 Resposta Imune Inata	29
2.1.2 Resposta Imune Adaptativa	33
2.2. A RESPOSTA IMUNE VACINAL DEPENDE DA COMPOSIÇÃO DAS VACINAS 38	
2.2.1 Tipos de vacinas BVDV e BoHV-1	38
2.2.2 O papel dos adjuvantes na resposta vacinal	41
2.2.3 Reações vacinais	45
2.2.4 Vacinas reprodutivas no Brasil	49
CAPÍTULO 1 – PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO POR VACINAS REPRODUTIVAS INATIVADAS COM DIFERENTES ADJUVANTES EM NOVILHAS HOLANDESAS	52
3 INTRODUÇÃO	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 FÊMEAS BOVINAS.....	54
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	55
4.2.1 Preparo das amostras	55
4.2.2 Soroneutralização.....	56
4.2.3 RT-PCR para o BVDV	57
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	58
4.4 MANEJO DAS NOVILHAS DURANTE O EXPERIMENTO	59
4.5 MOMENTOS DAS AVALIAÇÕES	60
4.6 AMOSTRAS	61
4.7 RESPOSTA IMUNE INATA.....	61
4.7.1 Hemograma completo	61
4.7.2 Ferro.....	62
4.7.3 Haptoglobina	62
4.7.4 Produção das espécies reativas de oxigênio	63
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5 RESULTADOS.....	67

5.1 RESPOSTA IMUNE INATA.....	67
5.1.2 Eritrograma.....	67
5.1.3 Leucograma.....	71
5.1.4 Haptoglobina	77
5.1.5 Produção de espécies reativas de oxigênio	79
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90
CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DOS ADJUVANTES SOBRE OS EFEITOS ADVERSOS E IMUNIDADE HUMORAL EM NOVILHAS VACINADAS CONTRA BVDV E BoHV-1	100
8 INTRODUÇÃO	101
9 MATERIAL E MÉTODOS	103
9.1 FÊMEAS BOVINAS.....	103
9.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	104
9.2.1 Preparo de amostras	104
9.2.2 Soroneutralização.....	105
9.2.3 RT-PCR para o BVDV	106
9.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	106
9.4 MANEJO DAS NOVILHAS DURANTE O EXPERIMENTO	107
9.5 MOMENTOS DAS AVALIAÇÕES	108
9.6 AMOSTRAS	108
9.7 EFEITOS ADVERSOS	109
9.7.1 REAÇÕES LOCAIS.....	109
9.7.1.1 Escore sinais cardinais.....	109
9.7.1.2 Mensuração da espessura da pele.....	109
9.7.1.3 Temperatura no sítio da injeção	110
9.7.2 REAÇÕES SISTÊMICAS	112
9.7.2.1 Escore de manifestações clínicas associadas à DRB	112
9.7.2.2 Escore de fezes.....	113
9.7.2.3 Efeitos colaterais indesejáveis.....	113
9.8 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA	113
9.8.1 Produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1	113
9.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	114

10 RESULTADOS	115
10.1 EFEITOS ADVERSOS	115
10.1.1 REAÇÕES LOCAIS	115
10.2 REAÇÕES SISTÊMICAS	119
10.2.1 Temperatura Retal	120
10.2.2 Escore associado à DRB	122
10.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA	124
10.3.1 Soroneutralização	124
11 DISCUSSÃO	128
11.1 REAÇÕES LOCAIS	128
11.2 REAÇÕES SISTÊMICAS	131
11.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA	133
12 CONCLUSÕES	136
REFERÊNCIAS	137
APÊNDICE 1	141
ANEXOS	142
ANEXO A – Tris Cloreto Amônia (NH ₄ Cl)	142
ANEXO B – Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (Concentrado)	143
ANEXO C – Azul de Tripán (0,4%)	144
ANEXO D – RPMI suplementado p/ 500mL	145

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo-1 (BoHV-1) causam doença reprodutiva em fêmeas bovinas que impacta negativamente na viabilidade econômica no sistema de produção. Estes vírus podem causar abortamentos em vacas prenhas, além das perdas vinculadas à menor taxa de concepção, morte embrionária precoce, nascimento de prematuros, natimortos e nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI). Neste contexto, as vacinas reprodutivas representam uma estratégia para limitar as perdas reprodutivas causadas pelas infecções virais (WALZ et al., 2017).

No Brasil estão disponíveis aproximadamente 14 vacinas comerciais polivalentes para as viroses reprodutivas, sendo a sua maioria inativada. Atualmente existe uma tendência para o registro de vacinas vivas modificadas, porém apenas uma vacina recombinante contra BVDV e outra vacina contendo o BoHV-1 termossensível estão licenciadas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL et al., 2017a).

As vacinas inativadas são menos imunogênicas que as vacinas vivas, devido a incapacidade do antígeno morto penetrar e multiplicar-se nas células imunes do hospedeiro. Em uma tentativa de amplificar a resposta imune induzida pelas vacinas inativadas, as formulações disponíveis apresentam maiores concentrações de antígenos diluídos em potentes adjuvantes, como o hidróxido de alumínio, saponinas e compostos oleosos (VARTAK; SUCHECK, 2016). A grande desvantagem destas composições está associada aos efeitos adversos exacerbados, tanto local como sistêmico.

Os efeitos adversos oriundos da vacinação devem ocorrer porque sinalizam para a indução da resposta inflamatória, que é fundamental para a ativação da resposta imune adquirida celular (Th1) e humoral (Th2). A vacina ideal deveria induzir as respostas Th1 e Th2 com o mínimo de reações adversas (RIDPATH et al., 2010).

Diante dos fatos abordados, a hipótese desta pesquisa foi de que os diferentes tipos de adjuvantes presentes nas vacinas reprodutivas inativadas induzem diferentes graus de resposta inflamatória e resposta imune adaptativa contra o BVDV e BoHV-1.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar os efeitos adversos, resposta inflamatória e produção de anticorpos induzida por três vacinas contendo diferentes tipos de adjuvantes.

Devido à complexidade do assunto o mesmo será melhor apresentado e discutido no próximo capítulo de revisão de literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este tópico apresentará os aspectos essenciais relacionados à resposta imune vacinal com ênfase no papel dos adjuvantes frente ao desenvolvimento de uma resposta imune efetiva.

2.1 VACINOLOGIA

A palavra vacina, vem do latim *vacca*, Edward Jenner foi o responsável pela primeira descoberta de uma vacina contra a varíola humana, revolucionando assim o cenário da medicina preventiva. No conceito original, a vacinação visa induzir o desenvolvimento da imunidade adquirida pela inoculação de componentes imunogênicos de um patógeno específico ou de microrganismos intimamente relacionados. Além disso, as vacinas são comumente utilizadas para a prevenção de manifestações clínicas após uma infecção, controle ou até mesmo a erradicação de uma determinada enfermidade (MEEUSEN et al., 2007).

Desencadear uma resposta imune protetora mediada pela vacinação é um desafio complexo, a efetiva proteção é ocasionada por um série de mecanismos imunológicos que acontecem simultaneamente na tentativa de combater um antígeno específico. Como em muitas outras espécies, a resposta imune dos bovinos baseiam-se em dois ramos principais: resposta imune inata e adquirida, sendo essas, vias interativas entre si para proporcionar uma resposta imune eficaz frente as vacinações.

2.1.1 Resposta Imune Inata

O sistema imune inato é constituído por diferentes mecanismos celulares e químicos capazes de combater microrganismos no local da infecção, estabelecendo assim um complexo de reações caracterizada como inflamação (SILVA, 1978).

A cascata inflamatória é suscitada pelo reconhecimento do antígeno vacinal injetado. A pele é a primeira barreira física encontrada pelos patógenos, além de cumprir um papel protetivo, a pele é um componente determinante para que se possa originar uma resposta inflamatória local, isto porque a pele é rica em células apresentadoras de antígenos (APCs), macrófagos e principalmente células dendríticas (BOS; KAPSENBERG, 1986).

Estudos relatam que as características das células dendríticas presentes na pele, sangue, intestino, gânglios linfáticos e placas de *Peyer* dos bovinos, ovinos e suínos são semelhantes aos humanos e camundongos, e afirmam que o fornecimento de antígeno à pele e aos tecidos subcutâneos aumentam o direcionamento de células APCs para uma maior resposta imunológica localizada (SUMMERFIELD; GAEL; RICKLIN, 2015), fenómeno fundamental para que se possa iniciar uma resposta vacinal.

As células dendríticas presentes na epiderme, derme e tecido subcutâneo são consideradas inativas e imaturas. Para que estas células amadureçam e migrem para os linfonodos uma sequência de eventos devem ser desencadeados. Primeiro ocorre o reconhecimento das estruturas moleculares altamente conservadas, que são compartilhadas por grandes grupos de microrganismos, chamados Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (*Pathogen Associated Molecular Pattern*-PAMPs) (CATRON et al., 2004; TIZARD, 2008). Os PAMPs se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões (*PRRs- Pattern Recognition Receptors*) localizados na membrana ou dentro do citoplasma das células dendríticas que resulta na sua ativação e em seguida maturação. Alguns dos PRRs são chamados de receptores do tipo *Toll* (*Toll Like Receptors*-TLRs). Estes receptores estão presentes nas superfícies celulares (TLR 1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou em membranas endossômicas dentro das células (TLR 3, 7, 8 e 9) que reconhecem componentes bacterianos e virais, respectivamente (WERLING et al., 2006). Os receptores do tipo TLR conhecidos para os vírus da IBR e BVD são o TLR3 e TLR7 (LEE et al., 2008; MARIN et al., 2016).

Após a ligação de um TLR presente nas células a um PAMP microbiano, um sinal é enviado à célula e ocorre a ativação dos genes que codificam as citocinas, primeiramente como pró-moléculas que devem ser ativadas por uma enzima denominada caspase-1 (*CysteinyI-aspartat especific proteinases*). Na vacinação, os antígenos são processados inicialmente pelos macrófagos (APCs) que chegam entre 5 a 6 horas após o início do processo e secretam as citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), e também fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que por sua vez sinalizam para o recrutamento das células APCs adicionais incluindo mais macrófagos, monócitos e células dendríticas no local da inflamação (CHASE; DANIELS; GARCIA, 2008).

A liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos sítios inflamatórios são aumentadas devido ao efeito parácrino, ou seja, as citocinas não se ligam apenas aos receptores TLR's das células APCs que a produziram, mas também aos receptores de células vizinhas, este fato irá propiciar uma produção sistêmica das citocinas na circulação (CATRON et al., 2004). Deste modo o estado de inflamação é gerado, pois as citocinas alcançam o hipotálamo e outros ramos cerebrais estimulando assim a produção de prostaglandina-E2, substância que induz hipertermia e redução do apetite. Além disso, as citocinas também atuam na glândula pituitária desencadeando a liberação de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) e consequentemente desencadeando a produção das proteínas de fase aguda pelo fígado. Na medula óssea agem de forma que as células do estroma e macrófagos ocasionem a liberação da glicoproteína fator estimulador de colônias de granulócitos (*G-CSF-Granulocyte-colony stimulating fator*), e a produção adicionais de leucócitos necessários para o desenvolvimento da resposta imune, fatos ilustrados na figura 1 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias estimulam o fígado por um efeito direto e também indireto por meio do cortisol produzido pelo córtex adrenal. Um dos efeitos fisiológicos do cortisol é a degradação dos tecidos, tais como células hepáticas, adiposas e musculares, esta degradação por sua vez pode ser reconhecida pelo sistema imune inato como uma interrupção da homeostase, as células então tornam-se mais ativas e iniciam a síntese de citocinas pró-inflamatórias adicionais, predominantemente interferon-gama (IFN- γ), IL-1 β , IL-6 e TNF- α (GABAY; KUSHNER, 1999; NELSON; COX, 2006), ambas às vias ativadas resultam na liberação das principais proteínas de fase aguda para os bovinos, como fibrinogênio, haptoglobina (HP), proteínas C reativas (CRP) e amiloide sérica A (CARROLL; FORSBERG, 2007).

Figura 1 – Resposta sistêmica em virtude de resposta inflamatória aguda – São Paulo – 2017

Fonte: adaptado de Murphy; Travers; Walport (2010), por Baccili, C. C. (2017)

A detecção da ativação da resposta imune inata com mensurações séricas de proteínas e citocinas pró-inflamatórias são dificultadas devido ao seu curto período e diferentes períodos de metabolização. Carroll et al. (2009) avaliaram o perfil de resposta inflamatória aguda em bovinos induzida por meio da administração de 2,5mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS). Análises das concentrações de cortisol, citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, assim como indicadores de estado térmico, incluindo temperatura retal, temperatura ruminal, respiração, sudorese e temperatura cutânea foram medidos em intervalos de 30 min entre 2h a 8h em relação ao desafio. Os autores observaram aumento das concentrações séricas de cortisol entre 1h à 4h (50-60ng/mL), o pico de TNF- α foi detectado apenas 1h (7.500pg/mL) após desafio, IL-1 β entre 2h a 4h (50pg/mL), IL-6 um pouco mais tardia entre 2h e 8h (2.500 a 1.500 pg/mL), IFN- γ entre 3 e 4h (120 pg/ml) e amilóide sérica A de 3 a 8h (80mg/dL). A

respiração (0.5h), temperatura retal (4.5h) e a temperatura dérmica (1h) também foram aumentadas.

Arthington et al. (2013) estudaram o efeito da vacinação na resposta das proteínas de fase aguda e também diante ao desempenho de crescimento em bezerros pós desmame. G1) vacina inativada contra *Mannheimia haemolytica* (One Shot, Zoetis Inc., NY), G2) vacina inativada contra *Clostridium* em adjuvante comercial Stimugen® (UltraBac 7; Zoetis Inc., NY); G3) controle não vacinado - solução salina. As coletas sanguíneas foram feitas nos dias D0, D1, D3, D5, D7, D10 e D14, enquanto o peso corpóreo foi mensurado no D0 e D21. As concentrações plasmáticas de haptoglobina, fibrinogênio e ceruloplasmina aumentaram em bezerros vacinados principalmente em D3 e D5. Os tratamentos não tiveram efeito em relação ao crescimento dos bezerros.

Em um segundo estudo Arthington et al. (2013) avaliaram a resposta inflamatória de PFA e eficiência alimentar de 23 novilhas vacinadas: foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos: G1) vacina inativada contra *Mannheimia haemolytica* (One Shot, Zoetis Inc., NY), G2) vacina inativada contra *Clostridium* em adjuvante comercial Stimugen® (UltraBac 7; Zoetis Inc., NY); G3) controle não vacinado. O soro foi coletado em D0, D3, D6, D9, D12 e D15. Durante este período, o consumo alimentar individual das novilhas foi mensurado utilizando-se um sistema automatizado. As concentrações plasmáticas de ceruloplasmina aumentaram nas novilhas vacinadas em D3, D6, D9 e D12 em comparação às novilhas controle. O ganho médio diário e a conversão alimentar foram maiores para o controle em relação às novilhas vacinadas (1,14 vs. 0,87 kg/d e 0,13 e 0,10kg, respectivamente). Os autores concluíram que dentro de um período de 2 semanas após a vacinação, os bovinos apresentaram uma resposta de PFA, o que pode resultar em uma redução de ganho de peso e eficiência alimentar.

Lippolis et al. (2017) verificaram que novilhos desafiados com LPS apresentaram diferentes picos de respostas para os marcadores inflamatórios e cortisol após o desafio: TNF- α às 2h, cortisol entre 12h e 16h e haptoglobina plasmática entre 24h e 72h. Além disso, os autores observaram maiores teores de ácidos graxos não esterificados (NEFA) entre 6 e 48h, insulina e glicose às 2h e aumento nas concentrações de leptina às 8, 12, 16, 36, 48 e 60h após o desafio. Assim, o grupo de estudo concluíram que a administração de LPS reduziu transitoriamente o consumo de matéria seca em novilhos através de reações inflamatórias que modulam a motilidade

gastrointestinal e a saciedade no sistema nervoso central, além de potenciais interações endócrinas microbioma-hospedeiro.

Diante destas abordagens observa-se que o sistema inato é o primeiro a ser ativado e responde quase que imediatamente após a vacinação e/o estímulos antigênicos, o mal necessário da inflamação deve ocorrer, porém o sistema imunológico é regulado pela resposta anti-inflamatória para prevenir a resposta excessiva que ocasionará prejuízos na imunidade, ganho de peso (acidose e cetose) e bem-estar animal (SORDILLO et al., 2016).

2.1.2 Resposta Imune Adaptativa

A resposta imune mediada por células induzida pela vacinação é gerada inicialmente pela ativação das células dendríticas durante o processo de maturação/ativação. As células dendríticas ativadas aumentam a expressão da molécula de MHC II em 5 a 10 vezes, o que indica maiores quantidades de antígeno na superfície das APC's, tornando-as melhores alvos para interagir com as células T helper (Th) (CHASE, 2007). Após ativação, as células dendríticas interrompem o processo de fagocitose ao mesmo tempo que ativam as vias intracelulares de sinalização para a secreção de moléculas fundamentais para a interação, apresentação e ativação de outras células do sistema imune inato e adquirido (CHASE; DANIELS; GARCIA, 2008). O destino das células dendríticas ativadas são os nódulos linfáticos para a sua interação com os linfócitos naïve (Figura 2).

Os linfócitos migram dos órgãos linfóides primários - medula óssea ou timo - para os órgãos linfóides secundários por meio de receptores específicos, como as moléculas de adesão L-selectina (CD62L), CCR7 e LFA-1, que medeiam as ligações entre as células imunes e as células endoteliais altamente especializadas das vênulas dos gânglios linfáticos para entrar na parte central dos linfonodos (VON ANDRIAN; MACKAY, 2000).

Os linfócitos que migram e adentram nos linfonodos residem num espaço chamado paracórtex, sendo a parte medular rica em células T local e a porção cortical rica em folículos contendo células B. Estas regiões são muito próximas, além de não existir nenhuma estrutura membranosa separando-as, o que possibilita a interação das

APCs com os linfócitos por meio de receptores de membrana TCRs (*T cell receptors*) e BCRs (*B cell receptors*) (CATRON et al., 2004).

Após este encontro com as células APC's, os linfócitos Th0 passam por um processo de diferenciação em células Th1 ou Th2 (CATRON et al., 2004).

Após este encontro, as células APCs produzem IL-12, que estimula a diferenciação de Th0 em Th1 produtores de IL-2 e IFN- γ , que promovem resposta imune mediada por células do tipo Th1. Outros estímulos induzem a diferenciação das células Th0 em Th2 produtoras de IL-4, IL-5 e IL-13. (CATRON et al., 2004). Por volta de 2003, duas novas subpopulações de células T CD4⁺ efetoras foram reconhecidas, as T regulatórias (Treg) expressando citocinas TGF-beta e IL-10 e àquelas que possuem perfil to tipo Th17 que secretam as citocinas IL-17A e IL-22 (ZHU et al., 2010). As citocinas produzidas pelas células Th17 recrutam os neutrófilos para os tecidos periféricos inflamados (ROARK et al., 2008).

Figura 2 — Interação das células dendríticas e linfócitos no linfonodo – São Paulo – 2017

Fonte: adaptado de: Benichou et al., 2011 por Baccili, C. C. (2017). Legenda: LC: células de Langerhans; T cell: células T; DC: células dendríticas; Blood vessel: vaso linfático.

As células do tipo Th1 reconhecem antígenos virais por meio dos TCRs e são responsáveis pela diferenciação dos linfócitos em células T citotóxicas CD8⁺, que possuem como principal funcionalidade atividade citotóxica contra vírus. Linfócitos CD8⁺ estimulados estão aptos a deixar os linfonodos e migrarem para circulação à procura de complexos MHC-I com peptídeos virais idênticos àqueles que induziram sua ativação para a destruição das células infectadas. As células TCD8⁺ ativadas secretam IFN- γ e TNF- α que desencadeiam também o recrutamento de mais células inflamatórias, como as células *Natural Killer* (NK). O IFN- γ produzido pelas TCD8⁺ e NK possui ação nas infecções virais por meio da inibição do crescimento de células infectadas e apoptose, restringindo assim a propagação do vírus, além de auxiliar na memória vacinal (CHASE; DANIELS; GARCIA, 2008).

Entre os componentes citotóxicos dos linfócitos TCD8⁺, encontram-se as perforinas, que possuem a capacidade de induzir a formação de poros na célula-alvo, além de granzimas, que penetram nas células por meio dos poros e ativam mecanismos intracelulares que culminam com a morte programada da célula infectada por microrganismos intracelulares (KREUTZ et al., 2012).

O vírus BoHV-1 possui capacidade de evitar o reconhecimento de células TCD8⁺ citotóxicas do hospedeiro, pois este vírus é constituído por uma proteína envelopada chamada UL49.5, que suprime a expressão MHC-I pelas células. Fato que permite uma replicação viral nas vias nasais e células epiteliais do trato respiratório superior (CHOWDHURY et al., 2014)

Por outro lado, as células com perfil Th2 produzem principalmente citocinas IL-4, IL-5 e IL-6. A IL-4 é capaz de induzir a ativação dos linfócitos B, que ativadas sofrem expansão clonal e diferenciam-se em células de memória ou células plasmáticas maduras que produzem anticorpos. O soro de um animal após distintos desafios imunológicos possuem diferentes tipos de anticorpos, que assim possibilitam o reconhecimento de diferentes epítomos na superfície do antígeno, estes anticorpos eliminam os microrganismos invasores por mecanismos de neutralização, aglutinação, ativação do sistema complemento com opsonização e/ou lise do patógeno. (CHASE, 2007).

A proteção humoral induzida pela vacinação podem ser asseguradas pelos anticorpos com atividades neutralizantes, ou seja, são direcionados contra proteínas de superfície dos vírions, neutralizando assim a sua infectividade. Este processo envolvem as Igs da classe IgA, presente nas mucosas e em secreções; ou por IgM e IgG,

presentes no plasma sanguíneo. As IgM e IgG possuem a capacidade de aglutinar partículas virais e, com isso, facilitar a sua remoção mediada pelo sistema complemento e por células fagocíticas. A opsonização é o revestimento de partículas víricas pelas Igs, que irá facilitar a ligação e remoção, via receptores para a porção Fc das Igs. A ativação do sistema do complemento também gera fragmentos capazes de opsonização viral (C3b), a ligação das Igs aos antígenos resulta em alterações tridimensionais na sua região Fc, expondo sítios de ligação para o componente C1 do complemento, iniciando a sua ativação em cascata (KREUTZ, 2012).

O desenvolvimento da resposta imune humoral após a primeira dose de uma vacina pode levar de três a quatro semanas para ocorrer, em seguida deverá ser impulsionada pela revacinação. No momento da primeira vacinação, a concentração de anticorpos não aumenta até 10-14 dias após a indução da resposta imune, em seguida, a concentração de anticorpos aumenta lentamente, atinge picos e diminui gradualmente em momento subsequente. Na revacinação (*booster*), a concentração de anticorpos aumenta rapidamente dentro de 24 horas e atinge um pico máximo em alguns dias, sendo essa resposta mantida por semanas ou meses (CHASE; DANIELS; GARCIA, 2008).

Em geral, as respostas imunes humorais frente às vacinações são mais fáceis de serem mensuradas que a imunidade mediada por células, especialmente pelo teste de Soroneutralização (SN), por ter a capacidade de detectar Acs neutralizantes. A SN é considerada o teste ouro para diagnóstico sorológico de BVDV e BoHV-1, trata-se de um ensaio *in vitro*, onde utiliza-se a inibição da infectividade para detectar anticorpos neutralizantes, já que os vírus não neutralizados pelos anticorpos infectarão as células induzindo alterações morfológicas (ECP), caso o soro do animal contenha anticorpos específicos contra o vírus utilizado, estes então serão neutralizados e as células permanecerão intactas, conseqüentemente, o ECP não será observado (RIBEIRO, 2009).

A busca para as amplificações imunológicas em relação ao aumento de atividade das células dendríticas, tem sido o gargalo para o sucesso das vacinações, visto que a intensidade na apresentação de antígenos determinam a capacidade e duração da resposta imune adquirida, além de estimulação para a produção de anticorpos neutralizantes (Figura 3).

Figura 3 – Esquema de resposta imune induzida pela vacinação – São Paulo – 2017

Fonte: adaptado de: Chase et al. (2015) por Baccili, C. C. (2017)

O ideal é que a resposta imune vacinal melhore as vias da imunidade específicas de acordo com o tipo de patógenos. As vacinas contra bactérias extracelulares deveria induzir imunoglobulina G para a opsonização da bactéria para fagocitose, ativação do sistema complemento e neutralização de toxinas. Sobre as superfícies mucosas, a IgA previne a adesão dos microrganismos, e a IgE ativa os mastócitos para reagir com patógenos invasores. Outros patógenos são eficientemente destruídos somente por reações mediadas por células. Para as bactérias intracelulares facultativas (*Mycoplasma*, *Brucella* e *Pasteurella*), os macrófagos devem ser recrutados. Se o patógeno é intracelular como vírus, *Listeria* ou protozoários devem ser recrutados linfócitos T citolíticos para a destruição da células infectada (SPICKLER; ROTH, 2003).

2.2. A RESPOSTA IMUNE VACINAL DEPENDE DA COMPOSIÇÃO DAS VACINAS

2.2.1- Tipos de vacinas BVDV e BoHV-1

Em geral, as vacinas comercializadas no Brasil são multivalentes com o objetivo de imunizar os animais contra vários patógenos em apenas uma administração, porém a grande quantidade de imunógenos e a mistura de diversas cepas virais e bacterianas podem ser um grande desafio imunológico para os animais, pois exigem respostas simultâneas contra os antígenos, mesclam antígenos imunodominantes com antígenos menos imunogênicos, incluem agentes imunossupressores, unificam a ocasião da aplicação e algumas mesclam preparações de vírus vivo com vírus inativado (FLORES, 2012).

Em relação às vacinas reprodutivas observa-se uma variedade de vacinas inativadas e com vírus vivo modificado (*Modified-live virus* – MLV) disponíveis no mercado internacional (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006), ao contrário do Brasil que apresenta predomínio de inativadas.

Classicamente as vacinas podem ser classificadas em atenuadas contendo o vírus vivo modificado, vacinas inativadas (mortas), vacinas de subunidade, vacinas de peptídeos sintéticos e em outro contexto as vacinas de DNA (ácido desoxirribonucleico) (LINDBERG, 2003).

As vacinas de vírus MLV são utilizadas devido a boa resposta na produção de anticorpos, maior duração da imunidade adquirida, menos doses necessárias por animal e menor custo na sua produção. Em contraposição, podem apresentar inconvenientes de causar danos ao hospedeiro, embora a virulência nos vírus *MLV* tem sido mínima, as mutações podem ocorrer e a pressão seletiva da resposta imune de um animal à essas vacinas pode gerar novas estirpes de vírus (CHASE, 2007). O BVDV possui altas taxas de mutação por meio da recombinação genética, que associadas a pressão seletiva, ou seja, um conjunto de condições ambientais favorecem o surgimento de determinados genes, e levam à ampliação da diversidade genética desse vírus (BOLIN; GROOMS, 2004; ARENHART, 2012).

Ainda dentro deste contexto, a tecnologia das vacinas permitem a elaboração das vacinas *MLV* recombinantes, onde também é dada em classificações como a *MLV*

pela deleção de genes, isto é, permitem que genes específicos das cepas virais sejam removidos, reduzindo assim a sua capacidade de virulência, destacando que o organismo está agora "marcado", de modo que os animais vacinados podem ser diferenciados de animais naturalmente infectados. Na Europa este tipo de vacina é obrigatória contra o BoHV-1, onde a glicoproteína E do vírus é deletada, as formulações dessas vacinas marcadas e testes de diagnósticos ainda são bastante discutidos (CHOWDHURY et al., 2014; ROMERA et al., 2014; WEISS et al., 2015; PAWAR et al., 2017).

Até o momento, o MAPA possui o registro de uma vacina *MLV* para BVDV, apesar de outras duas estarem em processo de registro. Esta vacina de BVDV registrada contém vírus vivo modificado não-citopático (NCP) BVDV do tipo-1 (strain KE-9) isolado da Alemanha e BVDV tipo-2 (strain NY-93) isolado dos Estados Unidos, com concentrações virais mínimas (10^3 TCID₅₀) na dose da vacina de 2mL. Ambas as cepas são modificadas geneticamente de forma idêntica por deleção da região de codificação das proteínas E^{ms} e N^{pro}, com exceção dos quatro códons terminais-N. Estas proteínas são conhecidas por sua alta virulência, pois possuem a capacidade de inibir a liberação da citocina antiviral IFN- γ por meio das células infectadas. Além disso, esta dupla deleção confere ausência de passagem transplacentária (PLATT et al., 2017).

Por definição vacinas inativadas contêm partículas virais mortas incapazes de causar replicação no animal, reduzindo assim o risco de infecção fetal em vacas prenhas, também são mais estáveis nas condições de campo e são menos custosas em relação à sua produção. Por outro lado, a fraca imunogenicidade das vacinas inativadas requerem uma maior concentração de adjuvantes, uma maior massa antigênica e animais primo-vacinais necessitam de repetidas doses para atingirem níveis protetores de anticorpos. O fato da necessidade de potencializações dos adjuvantes coloca em risco as reações locais, que além de prejuízos, impõe ao animal muito desconforto após múltiplas aplicações (SHAMS, 2005; NEWCOMERER et al., 2017). O início da imunidade das vacinas inativadas pode, portanto, ser adiado de quatro a seis semanas a partir do momento da vacinação inicial, pois induzem fraca resposta imune e de baixa intensidade, devido à sua incapacidade de se replicar nas células do hospedeiro (KELLING, 2004).

As vacinas de subunidade utilizam apenas a porção imunogênica de uma proteína, sendo utilizadas nesse sistema geralmente as glicoproteínas de envelope

e/ou proteínas do capsídeo (FLORES et al., 2012). Pesquisas estão focadas no potencial imunogênico da glicoproteína E2 como vacina de subunidade para BVDV (SNIDER et al., 2014; SADAT et al., 2017). Esta glicoproteína contém os principais sítios antigênicos para a produção de anticorpos neutralizantes que desempenham um papel fundamental na defesa contra a infecção (FULTON et al., 1997), porém ainda nenhum sistema disponível permite a ampliação da produção da glicoproteína recombinante a um custo acessível para as indústrias veterinárias (RUIZ et al., 2015).

Pecora et al. (2015) desenvolveram e testaram uma vacina de subunidade polivalente contra BVDV com base na glicoproteína E2 do vírus pertencente aos genótipos 1a, 1b e 2a. Os antígenos E2 foram expressos em ambiente eucariótico, ou seja, foram utilizadas células de insetos que neste caso foram infectados pelo baculovírus, esse ambiente oferece alto nível de expressão de proteínas heterólogas. Os bezerros foram vacinados e posteriormente desafiados com BVDV do tipo-1b ou tipo-2b, a fim de estudar a proteção conferida pela vacina experimental. A vacina foi considerada imunogênica pela indução de Acs neutralizantes e pela redução das manifestações clínicas dos animais desafiados, tais como hipertermia e leucopenia. De acordo com o autores, a vacina polivalente pode ser promissora, podendo ser utilizada como uma ferramenta segura e eficaz para controlar o BVDV nos rebanhos.

O amplo conhecimento sobre biologia molecular é a chave para a construção de vários genes de diferentes patógenos, o que possibilita a formulação de novas vacinas (SHAMS, 2005). As vacinas de DNA são produzidas a partir de técnicas de DNA recombinante, no qual é possível obter genes de diferentes patógenos capazes de induzir resposta imune protetora. O plasmídeo injetado é incorporado a célula do hospedeiro para a produção de proteínas. Recomenda-se a primovacinação com uma dose de vacina MLV ou inativada, sendo a vacina de DNA recomendada apenas como *booster* (CHASE, 2007).

As vantagens e desvantagens de cada tipo de vacina estão apresentados na tabela 1.

Em revisão realizada por Ruiz et al. (2015) destacou-se que 100% das vacinas comercializadas na bovinocultura no mundo são produzidas com vírus inativados ou atenuados. A aprovação e comercialização de vacinas recombinantes dependem em grande parte do custos em sua produção, o que acaba gerando a inviabilização do produto. Os autores ainda relatam que uma formulação de vacina veterinária considerada ideal seria aquela capaz de manter estável sua potência por pelo menos

um ano em conservação (no máximo 4°C), seguridade quanto aos efeitos colaterais, indução precoce de imunidade, uma proteção longa contra as doenças e infecções, que permite a diferenciação sorológica entre vacinação e infecção, e que fosse barata o suficiente para oferecer uma vantagem em relação ao custo-benefício.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens em relação aos diferentes tipos de vacinas

Tipos de vacinas	Vantagens	Desvantagens
Viva atenuada	Vacina potente, pois o agente infeccioso pode se replicar no hospedeiro	Risco de causar a doença no próprio animal
	Múltiplas doses não são necessárias. Dose única	A vacina é composta por antígenos vivos e a forma de conservação deve ser muito bem controlada
	Uma vez que o próprio microrganismo é utilizado, a resposta imune contra todos os antígenos é gerada	Não pode ser aplicada em animais imunossuprimidos ou que apresentem outras doenças
Morta/Inativada	Utilização segura em animais imunossuprimidos	Menos imunogênica que a vacina viva
	Não causa a doença	Requer aplicação de <i>booster</i>
	As condições de armazenamento não são tão rigorosas comparadas as vacinas vivas	Maiores concentrações de antígenos
Subunidade	Utilização segura em animais imunossuprimidos	Menos imunogênica que a vacina viva
	Não causa a doença	
	Devido ao componente antigênico purificado, menores possibilidades de efeitos colaterais	
DNA	Maior estabilidade comparada às outras vacinas	Alto custo de produção
	Facilidade na conservação	É possível a mutação no DNA do hospedeiro
	Um melhor controle sobre o <i>design</i> da vacina, o gene desejado pode ser adicionado ou excluído	

Fonte: adaptado de: Vartak e Sucheck (2016) por Baccili, C. C. (2017)

2.2.2 O papel dos adjuvantes na resposta vacinal

Os adjuvantes são substâncias químicas, componentes microbianos ou proteínas mamíferas que estimulam a resposta imune aos antígenos vacinais. O 1º

adjuvante registrado na literatura foi formulado por Freund et al. (1930), que desenvolveram uma mistura efetiva de óleo mineral, água e microbactéria inativada.

Os adjuvantes afetam primeiramente a resposta imune inata facilitando a captação dos antígenos pelas APC's (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) por diferentes vias, com posterior migração para os linfonodos e desencadeamento da resposta imune adquirida. Qualquer adjuvante que aumente a captação das células pelas APC's, pela maior expressão de MHC classe II e co-receptores, além de aumentar a migração dessas células para os linfonodos, são capazes de estimular a imunidade. Os adjuvantes que possuem efeito de depósito no sítio da injeção promovem um fornecimento contínuo do antígeno para as células apresentadoras, o que diminui a sua metabolização no fígado (SPICKLER; ROTH, 2003). Diante deste contexto, a resposta imune inata tem sido chamada de "A ciência dos Adjuvantes" (HEEGAARD et al., 2010).

Os mecanismos de ação dos adjuvantes são ainda obscuros, apesar da vasta literatura disponível sobre o assunto. Em geral os adjuvantes melhoram o processo de apresentação e estabilidade do antígeno, além de ser um potencial imunomodulador (SPICKLER; ROTH, 2003).

Os adjuvantes são apresentados em diversas formas: sais minerais (alumínio), emulsões de óleo, saponinas, complexos imunoestimulantes (*ISCOM* - *immunestimulating complexes*), derivados de carboidratos, derivados de bactérias e micropartículas poliméricas, dentre outros (SIVAKUMAR et al., 2011). Dentre estas categorias, na Medicina Veterinária os mais utilizados são o hidróxido de alumínio, emulsões oleosas e *ISCOMs*.

As ações geradas pelos sais de alumínio tem como base três fatores que podem agir de forma concomitante: 1) por meio do mecanismo de depósito; 2) adsorção do antígeno em agregados de sais que aumentam a eficiência da fagocitose pelas APCs; 3) por meio da ação direta dos cristais de alumínio sobre a via NALP3, a qual é expressa predominantemente em macrófagos, desta forma os cristais aumentariam a resposta imune inata, auxiliando as células dendríticas na interação e ativação das células TCD4⁺, resultando em altas concentrações de citocinas do tipo Th2, principalmente IL-4 e IL-13 (PLOTKIN, ORENSTEIN, OFFIT, 2013).

Morefield et al. (2005) relatam que após a vacinação, os antígenos podem fragmentar-se ou então permanecerem adsorvidos, ou seja, retidos na superfície do adjuvante hidróxido de alumínio. Os antígenos fragmentados são internalizados pelas

DC's por meio de macropinocitose, enquanto as partículas adsorvidas são internalizadas com o adjuvante por meio da fagocitose. Para avaliar a eficiência relativa dessas duas rotas, os autores incubaram as DC's oriundas de medula óssea de camundongos com o antígeno alfa caseína, marcados com fluorocromo na presença do adjuvante HA. As avaliações foram feitas por citometria de fluxo e microscopia em 0,5, 1, 2 e 3h após a incubação. A intensidade média de fluorescência das células dendríticas incubadas com a alfa caseína adsorvida foi quatro vezes maior do que as células dendríticas incubadas com alfa caseína em partículas. Assim, a internalização do antígeno pelas DC foi aumentada quando o antígeno permaneceu adsorvido ao adjuvante contendo o alumínio. Além disso, as células dendríticas e monócitos estimuladas pela adsorção dos antígenos induziram a produção de altas concentrações de citocinas IL-4 e IL-13 pelas células T CD4⁺ Th2 (POLLOCK et al., 2009). Sendo assim, pode-se dizer que os adjuvantes são imunomoduladores, além do seu efeito de depósito (AIMANIANDA et al., 2009).

As emulsões oleosas tem como forma de ação o efeito de depósito no sítio da injeção, porém a resposta gerada pelo óleo depende do tamanho dos glóbulos de gordura. Os óleos minerais usados nos adjuvantes geralmente são compostos por uma mistura de cadeias hidrocarbono de diferentes tamanhos. As pequenas cadeias são eficientes para induzir resposta imune, porém causam reações adversas exacerbadas, enquanto as cadeias longas (>C14) são seguras porém menos eficientes. A solubilidade e propriedades detergentes da cadeia pequena são provavelmente responsáveis pela reação local. Assim, cadeias de comprimento médio (C16 a C20) são preferidas. Os óleos não minerais altamente purificados são tolerados, porém são rapidamente metabolizados e eliminados do sítio da injeção, resultando em resposta imune fraca. O óleo mineral tende a permanecer no sítio da injeção e são progressivamente eliminados pelas células imunes competentes como os macrófagos, sendo parcialmente metabolizados até ácidos graxos, triglicérides, fosfolipídios e esterol (HEEGAARD et al., 2011).

As emulsões oleosas podem ser classificadas como água em óleo ou óleo em água. Emulsão é um sistema coloidal composto por dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de gotículas (0,1 a 20 µm). Nas emulsões água-óleo, a água está dispersa e o óleo é a fase contínua, enquanto que nas emulsões óleo-água ocorre o inverso. Geralmente são usados emulsificantes para estabilizar a emulsão.

Geralmente as emulsões água em óleo são recomendadas para os bovinos porque a imunidade a longo prazo é requerida. As vacinas contra Febre Aftosa são a base de óleo porque possibilita a vacinação bianual, enquanto que as vacinas com hidróxido de alumínio precisariam de ao menos dois *booster*. A princípio as emulsões água em óleo mineral podem induzir resposta imune mediada por células Th1 (HEEGAARD et al., 2011).

Estudo de Shen e Yang (2012) demonstrou que as emulsões oleosas induzem a apoptose e necrose do tecido, o que atrai DC e macrófagos para o local da aplicação com maior taxa de fagocitose. Após a fagocitose, as DCs adquirem antígenos das células apoptóticas e migram para os linfonodos locais induzindo uma boa resposta imune adaptativa e proliferação de células T. Por outro lado, Xiang et al. (2006) ressaltou que as emulsões água em óleo podem dificultar a fagocitose pelas células dendríticas resultando em fraca resposta imune específica.

Os *ISCOMs* formam nanopartículas, semelhantes a cápsulas esféricas compostas por colesterol, *amphigen* (fosfolípidios e glicolípidios) e derivados da saponina (*Quil A*).

O *Quil A* é uma forma altamente refinada de saponina derivada da planta *Quillaja saponaria* e possui capacidade de induzir uma forte resposta imune, tanto mediada por células Th1 como humoral Th2 (BEACOCK-SHARP et al, 2003; LYCKE, 2004). O 2º componente da mistura é o colesterol, substância bipolar tipo gordura (hidrofílica/hidrofóbica) de origem animal, que quando adicionado ao *Quil A* em uma proporção ideal, elimina parte dos efeitos indesejados da saponina sem comprometer a sua capacidade imunoestimulante e ainda ajuda a criar um sistema único de liberação do adjuvante. A imunogenicidade do complexo *Quil A* e colesterol é potencializada pela adição de *amphigen*, composto por fosfolípidios derivado da lecitina e um glicolípidios surfactante em um óleo leve altamente refinado. O *amphigen* oferece as vantagens de um adjuvante à base de óleo (BEACOCK-SHARP et al., 2003).

Os antígenos protéicos incorporados na estrutura esférica rígida composta pelos *ISCOMs* são extremamente imunogênicos. O *ISCOM* é um potente adjuvante por induzir a resposta imune mais generalizada que inclui resposta de hipersensibilidade tardia, aumento sérico de IgG1 e IgG2a, aumento da secreção de IgA na mucosa intestinal e produção de resposta Th1 e Th2 dependente de citocinas (BEACOCK-SHARP et al., 2003).

Anzilliero et al. (2015) avaliaram a imunogenicidade de oito vacinas disponíveis

no mercado brasileiro para os Herpesvírus bovino tipo- 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) e Vírus da Diarreia Viral bovina (BVDV-1, BVDV-2) por meio de soroneutralização. Novilhos de corte foram alocados em grupos de 10-12 animais e vacinados com duas doses, com intervalo de 30 dias. O grupo de estudo verificou que todas as vacinas induziram anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, sendo observados maiores títulos médios geométricos (4,8) para a vacina que continha como adjuvante *Quil A*, *cholesterol* e *amphigen*, sendo também a única a induziu resposta sorológica detectável frente ao BVDV-1 (GMT=6,7). Atividade neutralizante frente ao BVDV-2 foi detectada parcialmente nas vacinas compostas de hidróxido de alumínio e *Quil A*.

2.2.3 Reações vacinais

Os efeitos indesejáveis das vacinas podem ocorrer por negligências na aplicação das vacinas ou por mecanismos inflamatórios do próprio organismo animal. É possível que estes efeitos sofram influências da contaminação com agentes infecciosos, incapacidade de inativar agente da vacina morta, virulência residual dos antígenos da vacina, vacinação de animal imunossuprimido, imunodepressão induzida pela vacina, excessiva liberação de citocinas pró-inflamatórias, aplicações múltiplas e simultânea de diferentes vacinas, hipersensibilidade do animal aos antígenos vacinais, exacerbação de hipersensibilidade a antígenos não presentes nas vacinas, alergias, doenças autoimunes e indução de alterações neoplásicas. Além disso, a vacina *MLV* contra o BVDV pode desencadear a Doença das Mucosas em bovinos persistentemente infectados (ROTH, 1999).

Em geral, a aplicação das vacinas é realizada por meio de injeção parenteral intramuscular ou subcutânea. Os efeitos locais da vacinação refletem a resposta inflamatória local caracterizada pela presença dos sinais cardinais da inflamação como o edema, rubor, dor, calor e/ou perda de função. Do ponto de vista histopatológico, a reação inflamatória aguda é um fenômeno ocorrido em virtude à injeção inicial, caracterizada pela formação ou não de exsudato inflamatório, composto principalmente por fibrina, soro e leucócitos, observando-se predomínio de neutrófilos (WHEATER et al., 1985).

A dor, calor e rubor são causados pelo aumento do fluxo sanguíneo como consequência do aumento do diâmetro vascular. O aumento da permeabilidade vascular permite a separação de células endoteliais que se alinham ao vaso sanguíneo, levando ao extravasamento de fluídos, proteínas do sangue e acúmulo de tecidos. Esses eventos representam o edema associado com a inflamação (RYMAN et al., 2015). Em virtude deste processo inflamatório, a contagem dos leucócitos e neutrófilos no sangue poderão estar com valores elevados, assim como diminuição da contagem de monócitos devida a lesão tecidual (BALDRICK, 2016).

A inflamação aguda se inicia rapidamente e tem uma duração relativamente curta, de alguns minutos a várias horas. As principais características da inflamação aguda são exsudação de fluído e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. A inflamação crônica tem uma duração mais longa e está histologicamente associada a presença de linfócitos e macrófagos, a proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular e fibrose. Muitos fatores modificam o curso e a aparência morfológica da inflamação aguda e crônica (ROBINS; COTRAN, 2005).

A inflamação local exacerbada induz altos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α liberadas por macrófagos e outras células em resposta a infecção, endotoxinas e componentes dos adjuvantes da vacinas. Estas citocinas em altas concentrações são responsáveis pela resposta inflamatória aguda no local da injeção, síntese e secreção de proteínas de fase aguda, ação sobre o hipotálamo para indução de febre e apatia, diminuição no ganho e eficiência alimentar. Concentrações suficientemente altas de citocinas podem induzir hipoglicemia, reduzir o débito cardíaco, causar choque hipovolêmico e coagulação intravascular disseminada (ELLIS e YONG, 1997; GALANOS; FREUDENBERG, 1993).

Stokka et al. (1994) avaliaram 24 novilhos imunizados com vacinas clostridiais, e observaram as reações no local da injeção, resposta inflamatória sistêmica e o consumo de ração. Os animais foram distribuídos quanto ao tipo de vacina: G1 - receberam vacina contendo bactérias/toxóides de múltiplas espécies clostridiais; G2 - receberam vacinas contendo apenas *Clostridium perfringens* do tipo C e D; G3 - receberam solução salina. As reações locais foram observadas em todos os bovinos vacinados. Foram encontradas diferenças no tamanho das lesões em animais G1, em relação a G2 e G3. A resposta inflamatória à vacinação, mensurada pela concentração sérica da haptoglobina, foi maior em ambos os grupos vacinados em relação ao

controle. No entanto, o grupo G1 apresentou valores de haptoglobina pós-injeção mais elevados do que G2. Os animais que receberam vacina com múltiplas espécies de toxóide tiveram uma diminuição significativa de 20% no consumo de ração em resposta à segunda dose da vacina. Esses achados são indicativos de potenciais efeitos negativos da vacinação contendo múltiplos antígenos.

O efeitos adversos podem ser influenciados pelas interações dos adjuvantes com os antígenos específicos, além do tipo de vacina aplicada. O aumento de temperatura corpórea, redução da alimentação, apatia e queda na produção de leite são manifestações geralmente associadas às vacinas vivas. Os antígenos bacterianos em emulsão geralmente induzem reações locais mais exacerbadas porque contém compostos extremamente imunoestimuladores como fragmentos de lipopolissacarídeos ou peptidoglicanos, que são responsáveis pela indução de reações sistêmicas. As vacinas mortas/inativadas apresentam efeitos mais localizados em torno do local da injeção, especialmente quando os antígenos são diluídos em adjuvantes com efeito depósito devido ao retardo na apresentação do antígeno (HEEGAARD et al., 2011).

Leal et al. (2014) observaram lesões exacerbadas relacionados à vacinação com adjuvante oleoso contra febre aftosa em 1.815 de um total de 5.000 bovinos abatidos. As lesões de reação vacinal eram caracterizadas por nódulos protuberantes, circunscritos, bem delimitados, firmes e de tamanhos variáveis, distribuídos de forma multifocal na musculatura do aspecto lateral do pescoço; ao corte apresentavam exsudato purulento. Amostras de 28 bovinos foram avaliadas histologicamente observando-se piogranulomas com espaços claros circulares de tamanhos variados no centro, circundados por intenso infiltrado de neutrófilos íntegros e necróticos, macrófagos epitelióides com citoplasma vacuolizado, ocasionais células gigantes multinucleadas e, mais externamente, abundante tecido conjuntivo entremeado por linfócitos e plasmócito. Os autores afirmaram que as reações locais provavelmente são oriundas do adjuvante empregado na formulação da vacina. Este fato reforça a necessidade de um rígido controle de qualidade pela indústria farmacêutica de modo que as vacinas formuladas para a prevenção da febre aftosa não apenas garantam níveis satisfatórios de imunidade, mas também minimizem as possíveis reações adversas.

As reações sistêmicas das vacinações geralmente estão associadas à hipertermia, perda de peso, redução na produção de leite e/ou até alterações

neurológicos. As reações sistêmicas geralmente são relacionadas com as endotoxinas residuais proveniente das bactérias incluídas nas vacinas multivalentes, além do efeito pirogênico do antígeno e adjuvantes, destacando-se as emulsões oleosas e saponinas (MARTINOD, 1995).

A associação entre as reações sistêmicas e as endotoxinas das bactérias Gram-negativas devem ser revistas. Por hora, não existem requisitos de monitoração da concentração de endotoxinas e seu nível tóxico, o que pode variar entre marcas e lotes de um mesmo produto. Além disso, a potência das endotoxinas podem variar de acordo com o tipo de bactéria Gram-negativa utilizada. Os bovinos da raça Holandesa parecem ser mais susceptíveis às reações devido a predisposição genética. O número de tipos de bactérias incluídas nos calendários de vacinação podem contribuir significativamente para as reações indesejáveis, sendo assim como regra geral não devem ser administradas mais que duas vacinas gram-negativas no mesmo dia em bovinos de leite (CORTESE, 2011).

As reações anafilactóides e anafiláticas (hipersensibilidade tipo-I) podem ocorrer minutos ou horas após a aplicação da vacina, resultando em reações sistêmicas caracterizadas por apatia, dispnéia, tremores, edema pulmonar, aborto e até morte. Existem também as reações tardias vinculadas a hipersensibilidade tipo-III, observadas entre oito a vinte e cinco dias após injeção. O risco de reações de hipersensibilidade do tipo I e III aumentam após a 3ª ou 4ª vez que as vacinas são aplicadas (MARTINOD, 1995).

A anafilaxia é uma reação alérgica imunomediada, ocasionada pela liberação de mediadores inflamatórios a partir dos mastócitos e basófilos, por intermédio da imunoglobulina E (IgE) contra um imunógeno, ou seja, nesse tipo de reação a exposição prévia ao agente ou substância química é obrigatória. A reação anafilactóide refere-se a um evento clinicamente semelhante à anafilaxia, porém sem a participação da classe de imunoglobulinas. As reações anafilactóide podem ocorrer sem a sensibilização prévia do animal (LEVY; ROIZEN; MORRIS, 1976).

Na anafilaxia sistêmica, os anticorpos IgE ligam-se aos receptores de membrana de mastócitos, observando-se ativação celular quando a IgE de superfície liga-se aos alérgenos multivalentes, o que desencadeia o aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina e cálcio, com subsequente liberação de histamina, triptase, quinase, heparina e citocinas. Tais considerações não se aplicam às reações anafilactóides, por não ocorrer a formação de IgE contra a substância desencadeadora,

apesar da intensa desgranulação mastocitária existente (LOUZADA JR; DE OLIVEIRA; SARTI, 2003).

Apesar dos efeitos adversos, o desafio na pecuária de leite é intenso, em relação às raças de corte, porque as vacas leiteiras são mais exigidas fisiologicamente pela manutenção da gestação e lactação. Além da alta exigência nutricional, manejo mais intensivo e, consequentemente condições mais intensas de estresse (ALFIERI et al., 2017). Por estes motivos, recomenda-se que não apenas a vacina contra Leptospirose seja realizada semestralmente mas também àquelas indicadas para controle de BoHV-1 e BVDV BVD (AONO et al., 2013; WALZ et al., 2017).

2.2.4 Vacinas reprodutivas no Brasil

Vacas infectadas pelas viroses reprodutivas apresentam redução na fertilidade devido a diminuição da taxa de concepção, morte embrionária precoce ou ambos. Consequentemente, as fêmeas bovinas devem ser vacinadas contra BVDV e BoHV-1 antes do início do período de estação de monta, independentemente da forma, seja inseminação artificial ou reprodução natural. É recomendado que o protocolo de vacinação seja finalizado até 28 dias antes da estação de monta, especialmente quando a vacina inativada é utilizada. Novilhas vacinadas com *MLV* BVDV até 10 dias antes da estação de monta não prejudicou a reprodução (WALZ et al., 2014).

Silva, (2006) demonstrou que a resposta humoral de seis vacinas polivalentes inativadas comercializadas no Brasil contra o BVDV foi fraca, destacando que apenas uma vacina de origem americana induziu a formação de títulos de ACs neutralizantes contra esse agente viral.

Ferreira et al. (2011) avaliaram o efeito da vacinação contra BVDV, BoHV-1 e Leptospirose sobre a taxa de prenhez (TP) e perda gestacional (PG) de vacas nelores (n=268) inseminadas em tempo fixo. As vacas foram imunizadas com vacinas reprodutivas contendo hidróxido de alumínio em dia 0 (D0) da Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e com reforço em D30. Os animais vacinados em D0 apresentaram maior TP aos 30 dias (53,8%; 71/132), comparado com vacas não vacinadas (42,7%; 58/136). Houve tendência para TP quando as vacas foram avaliadas aos 60 dias (51,5%; 68/132) e controle (41,2%; 68/132). Contudo não foi observado efeito de

vacinação na taxa de perdas de gestação em vacas vacinadas (4,2%; 3/42) e controle (3,5%; 2/42). O perfil sorológico foi realizada pela técnica de SN, foram observados 94% de incidência de BVDV, 62%-IBR. A aglutinação microscópica indicou presença de ACs em 53% das vacas para leptospirose.

Aono et al. (2013) verificaram que as perdas de prenhez que ocorrem em torno dos 30 a 120 dias de gestação podem estar diretamente associados à doenças reprodutivas, como IBR, BVD e leptospirose, baseado no aumento das taxas de prenhez nos dias 30 e 120 em vacas de corte vacinadas antes da IATF com produto comercial polivalente contendo como adjuvante uma mistura de *Quil A*, *cholesterol* e *amphigem*. Segundo os autores, a vacinação foi eficaz na indução de ACs neutralizantes, além de resultado satisfatório durante a concepção, bem como durante o período gestacional.

Souto e Pizzo, (2014) utilizaram 1172 vacas Nelore recém-paridas provenientes de quatro fazendas localizadas no estado do Mato Grosso do Sul durante a estação de monta em 2013 e 2014. Os animais foram distribuídos em dois grupos dentro dos mesmos lotes de IATF. O grupo G1 foi vacinado contra o BoHV-1, BVDV e Leptospirose diluídos em hidróxido de alumínio, enquanto o G2 era composto por animais controle não-vacinados. Os animais G1 apresentaram taxas de prenhez na IATF de 58,2% comparado com 44,7% do grupo de controle.

Anziliero et al., (2015) avaliaram a eficácia de oito vacinas reprodutivas disponíveis no Brasil contra o Herpesvírus Bovino tipo- 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) e Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV-1, BVDV-2). Em relação ao BoHV-1 todas as vacinas induziram soroconversão em 100% do animais (10/10), com exceção de duas vacinas que induziram soroconversão em 8/10 e 9/10 dos garrotes vacinados. Em relação ao BoHV-5 todos os animais soroconverteram, com exceção de três vacinas que induziram respostas parciais. O interessante desta pesquisa é que apenas uma vacina contra o BVDV-1 induziu 100% de resposta sorológica, observando-se respostas parciais em quatro grupos e nula nos últimos três grupos. Atividade neutralizante frente ao BVDV-2 foi detectada parcialmente apenas em três vacinas. O resultados dos autores demonstram a realidade brasileira, no qual o componente BoHV-1 da maioria das vacinas comerciais apresentou imunogenicidade adequada, enquanto a grande maioria das vacinas contra o BVDV-1 apresentou resposta parcial ou até mesmo nula, especialmente contra o BVDV-2.

Em relação à reprodução bovina, o grande desafio é a elaboração de protocolos estratégicos para uma melhor resposta vacinal conjuminando com o manejo dos animais e protocolos vinculados à reprodução, considerando-se que os momentos ideais para ambos são diversificados. Embora o tema seja bastante contundente, não há estudos comparando as diferentes repostas sistêmicas e locais geradas pelos principais adjuvantes presentes nas vacinas reprodutivas, visando elucidar a resposta inflamatória induzida pelos imunógenos utilizados a campo.

**CAPÍTULO 1 – PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO POR VACINAS
REPRODUTIVAS INATIVADAS COM DIFERENTES ADJUVANTES
EM NOVILHAS HOLANDESAS**

3 INTRODUÇÃO

A vacinação tem sido frequentemente utilizada para reduzir perdas reprodutivas associadas com as infecções causadas pelo BVDV e BoHV-1.

A cascata de eventos ocorridos após a vacinação inicia-se com a ativação quase que imediata do sistema imune inato. Os antígenos são capturados e processados inicialmente pelos macrófagos (APCs), células que secretam citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), que por sua vez sinalizam para o recrutamento das células APCs adicionais incluindo macrófagos, monócitos e mais células dendríticas no local da inflamação. A liberação destas citocinas no sítio da injeção desencadeia a liberação de hormônios, proteínas de fase aguda e fatores estimuladores de colônias granulocíticas para a produção adicional de leucócitos (CATRON et al., 2004; CHASE; DANIELS; GARCIA, 2008).

A resposta inflamatória e a imune mediada por células ocorrem simultaneamente, de acordo com a apresentação gradual do antígeno pelas APC's nos nódulos linfáticos, onde ocorre a interação dessas células com os linfócitos T CD4⁺ *nãive* (1ª interação), que posteriormente diferenciam-se em células T efetoras do tipo Th1 ou Th2. Linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B migram do timo e medula óssea, respectivamente, para os linfonodos, local onde ocorre a 2ª interação imune entre o TCD4⁺ tipo Th1 com as células TCD8⁺ ou TCD4⁺ tipo Th2 com as células B. Após as interações, as células TCD8⁺ e células B transformam-se em células efetoras ou células de memória (CATRON et al., 2004; CHASE; 2007; ROARK et al., 2008; ZHU et al; 2010).

A chave para uma resposta vacinal efetiva depende principalmente da ativação de um maior número de células dendríticas para a amplificação da 1ª interação ocorrida com os linfócitos T *helper* nos linfonodos, o que pode ser obtido com o uso de adjuvantes. Os adjuvantes são muito importantes nas vacinas inativadas, no qual os antígenos mortos geram resposta imune de menor intensidade, quando comparada às vacinas vivas, por não multiplicarem-se nas células imunes do hospedeiro (VARTAK; SUCHECK, 2016).

A composição das vacinas inativadas com maior massa antigênica diluída em potentes adjuvantes possui maior risco de gerar resposta inflamatória local e sistêmica

exacerbada, porém estas informações precisam ser melhor estudadas. Diante do contexto apresentado, a hipótese desta pesquisa é que os adjuvantes das vacinas reprodutivas inativadas induzem diferentes intensidades de resposta inflamatória sistêmica.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória sistêmica induzida pelas vacinas reprodutivas inativadas contendo diferentes adjuvantes em novilhas Holandesas, por meio do perfil leucocitário, produção de espécies reativas de oxigênio pelos fagócitos, dosagem de haptoglobina e ferro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 6229201216.

4.1 FÊMEAS BOVINAS

As fêmeas desta pesquisa eram oriundas da fazenda experimental da Agência Paulista e Tecnologia do Agronegócio – APTA Gado de Leite, localizada na cidade de Nova Odessa – São Paulo (22°75'S de latitude e 47°27'W de longitude). Esta propriedade foi selecionada por não realizar vacinação para BVDV e BoHV-1 e possuir histórico de baixa soro-prevalência (13%) para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). O protocolo sanitário adotado pela fazenda é composto apenas pelas vacinas obrigatórias exigidas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Febre Aftosa e Brucelose (BRASIL, 2017b).

A etapa experimental à campo foi conduzida entre Novembro de 2015 a Março de 2016 entre o verão e outono. Neste período, as novilhas entre 15 a 24 meses de idade, eram mantidas sob manejo extensivo com fornecimento de água e sal mineral “*ad libitum*”. Trinta e cinco novilhas foram selecionadas, das quais 68,57% (24/35) não haviam sido inseridas nos protocolos de Inseminação Artificial (IA); 17,14% (6/35) estavam prenhas com idade gestacional ao redor de 90 dias; e 14,28 (5/35) haviam

sido inseminadas um mês (5/10/2015) antes do início das atividades desta pesquisa. As identificações, idades e o manejo reprodutivo adotado pela fazenda durante o período experimental estão descritos no apêndice 1.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As 35 novilhas selecionadas previamente foram investigadas para a exclusão de infecções para o BVDV e BoHV-1. Amostras de soro sanguíneo e sangue total foram obtidas para a soroneutralização (SN) para BVDV e BoHV-1, além da reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase para BVDV (RT-PCR). A RT-PCR do sangue total para o BVDV foi repetida após 21 dias para a distinção entre possível infecção transitória ou persistente.

4.2.1 Preparo das amostras

a) Obtenção do soro sanguíneo

O soro sanguíneo das novilhas foi obtido a partir de sangue colhido em tubos sem anticoagulante, centrifugados a 800 x *g* por 15 minutos. Após a retração do coágulo, o soro foi retirado e acondicionado em microtubos.

b) Separação de *buffy coat*

Amostras de sangue foram coletadas em tubos com ACD (Ácido Cítrico Citrato de Sódio e Dextrose) do tipo vacutainer®, em seguida, as amostras foram homogeneizadas por inversão 10 vezes. Os tubos foram centrifugados a 800 x *g* por 15 minutos a 18° C. Após a centrifugação, o plasma foi descartado e a camada de

leucócitos (*buffy coat*) removida. Em seguida, os leucócitos foram lisados pela adição da solução de lise Tris-cloreto amônia (0.01 M Tris em 0.85% NH₄Cl) (Anexo A), o quão suficiente para se obter 14mL de solução final. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em estufa de CO₂, a 37°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados em 450 x *g* por 10 minutos, em seguida, as células foram lavadas em 5mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Anexo B) por duas vezes a 450 x *g* por 5 minutos. Após a última lavagem, o *buffy coat* foi ressuspendido em 1mL de PBS em tubos tipo eppendorf e centrifugados em 900 x *g* por 1 minuto. Por fim, retirou-se o PBS e o *buffy coat* foi acondicionado em microtubos nucleasse *free* e conservados a -80°C para a realização do RT-PCR.

As amostras foram processadas no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico.

4.2.2 Soroneutralização

A técnica de SN foi realizada estritamente de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2017) no Laboratório de Viroses de Bovinos - Instituto Biológico. Para tanto, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando uma diluição constante do soro em log₂ a partir das diluições 1:10 (BVDV-NADL) e 1:2 (BoHV-1-Los Angeles) tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM (*Minimum Essential Medium*) contendo 1% de antibióticos e 5% de soro fetal bovino livre de anticorpos para BVDV.

Para o BVDV, o soro foi previamente diluído 1:5 antes de adicioná-los aos poços, o BoHV-1 com diluição inicial 1:2 foram adicionados 50 µL de soro em duplicatas nas cavidades das placas, no qual adicionou-se 50 µL da solução do respectivo vírus contendo TCID₅₀/100µL (50% *tissue culture infective doses*). Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora para BVDV e por 18-24h para BoHV-1, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, suspensão de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) foram adicionadas em cada cavidade das placas. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 4-5 dias.

A infectividade foi indicada pelo “Efeito Citopático” (ECP) visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido. O título de anticorpos foi expresso como

a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade e consequentemente o ECP em ambas as cavidades de cada diluição. A potência do vírus foi observada na retrotitulação através do cálculo do título, de acordo com Reed e Muench, (1938).

4.2.3 RT-PCR para o BVDV

A extração do ácido nucléico foi feita empregando-se solução comercial (Trizol LS® Reagent)¹. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) convencional foi realizada de acordo com as instruções do manual do fabricante do kit comercial².

Os primers utilizados na reação detectaram regiões comuns para BVDV 1, 2 e Hobi-like baseados em uma sequência de 290 nucleotídeos, localizados na região 5' não traduzida (5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3' e 5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3') de acordo com Weinstock et al., (2001). O material genético amplificado foi introduzido em poços em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X à voltagem de 100V por uma hora. Os amplicons foram evidenciados após coloração com gel red diluído (1:150) em nuclease free water³, e a visualização foi feita utilizando o transluminador sob luz ultravioleta (320nm). Os fragmentos de DNA foram comparados com o padrão de pares de base apresentando incrementos de 100 pb (DNA ladder de 100 pb)⁴. As amostras foram consideradas positivas quando a amostra testada apresentou uma banda no tamanho do controle positivo e negativo na ausência de banda.

¹ Invitrogen®, São Paulo-SP, Brasil.

² Access Quick™ RT-PCR System, Promega, São Paulo-SP, Brasil.

³ Promega®, São Paulo-SP, Brasil.

⁴ Invitrogen®, São Paulo-SP, Brasil.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As novilhas selecionadas foram distribuídas de forma randomizada em quatro grupos experimentais denominados de acordo com a formulação das vacinas comerciais administradas: Halum (n=9), Oleosa (n=10), Prezent A (n=10) e Salina (n=6), conforme ilustrado no quadro 1.

As novilhas receberam duas doses de diferentes vacinas comerciais (5mL), com intervalo de 21 dias, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os animais do grupo não-vacinado receberam injeção de solução salina (5mL) nos momentos previstos para as vacinações. A via de aplicação realizada foi a subcutânea na região da tábua do pescoço do lado direito (figura 4).

Quadro 1 - Constituição dos grupos experimentais de acordo com a composição de cada vacina – São Paulo – 2017

Grupos	Adjuvantes	Cepas
Halum (n=9)	Hidróxido de alumínio (Alhydrogel®)	BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 – inativado, cepas cedidas pelo INTA e CEVAN
		BoHV-1 (Los Angeles) - inativado
Oleosa (n=10)	Emulsão com óleo mineral	**BVDV-1 e BVDV 2 (inativado)
		BoHV-1 e BoHV-5* (inativado)
Prezent A (n=10)	Combinação de Saponina Quil A®, colesterol e Amphigen®	BVDV-1 (5960) e BVDV-2 (53637) – inativado
		BoHV-1 (Cooper) – quimicamente alterada termossensível
Salina (n=6)	-	Aplicação de solução salina

Fonte: (BACCILLI, C. C., 2017).

Legenda: CEVAN = Centro de Virología Animal, Argentina; INTA=Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina; **Cepas não fornecidas pelo fabricante.

Figura 4 - Aplicação das vacinas na região da tábua do pescoço – São Paulo 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2016).

4.4 MANEJO DAS NOVILHAS DURANTE O EXPERIMENTO

No dia da vacinação (D0) e *booster* (D21), as novilhas eram manejadas em dois momentos:

- 1.) 22:00 até 00:00 - avaliações prévias às injeções e aplicação das vacinas;
- 2.) 4:00 às 6:00 – 1ª avaliação após a aplicação das vacinas

Nos momentos posteriores às vacinações e *booster*, as novilhas eram transferidas do pasto (figura 5a) para o curral de espera (figura 5b) às 17 horas do dia anterior às coletas. Na manhã seguinte, as novilhas eram transferidas para troncos de contenção (figura 5c e 5d) para a realização das avaliações.

Figura 5 - Pasto (a); curral de espera (b); brete de contenção (c, d) - São Paulo – 2017

(a)

(b)

(c)

(d)

Fonte: (BACCILI, C. C., 2016).

4.5 MOMENTOS DAS AVALIAÇÕES

Os efeitos adversos foram avaliados antes (0 horas) e após a aplicação das vacinas às 6, 24, 48, 72 e 168 horas (Figura 2a). A resposta imune adaptativa para o BVDV e BoHV-1 foram determinados no momento da vacinação (D0), no dia do *booster* (D21) e 21 dias (D42) após a segunda dose da vacina, conforme ilustrado na figura 6.

Figura 6 - Diagrama representativo das avaliações – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: 0h: antes da aplicação da vacina; 6h - seis horas após aplicação; 24h: 1 dia; 48h: 2 dias; 72h: 3 dias; 168h: 7 dias após vacinação;

4.6 AMOSTRAS

Foram colhidas amostras de sangue total com EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic acid) a 7,4 mg para realização do hemograma e mensuração da produção das espécies reativas de oxigênio (EROS); e em tubos sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção de soro sanguíneo para dosagem de haptoglobina, determinação de títulos e concentrações de anticorpos específicos contra o BVDV e BoHV-1.

4.7 RESPOSTA IMUNE INATA

A resposta imune inata das novilhas foi avaliada por meio do hemograma, produção de espécies reativas do oxigênio pelos fagócitos e dosagem de haptoglobina.

4.7.1 Hemograma completo

O número total de leucócitos sanguíneos e os componentes hematológicos (hemácias - He, hemoglobina - HGB, hematócrito – Hto, Volume Corpuscular Médio -

VCM, Hemoglobina Corpuscular Média - HCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média – CHCM) foram obtidos por sistema automático⁵.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por metodologia manual observando-se as características morfológicas das células a partir dos esfregaços sanguíneos por microscopia óptica no aumento de 1.000x (BIRGEL; BENESI, 1982).

4.7.2 Ferro

Alíquotas de soro foram descongeladas em geladeira (overnight), homogeneizadas em homogeneizador automático para posterior realização do teste em analisador bioquímico automático⁶. Para a dosagem da concentração de ferro foi utilizado kit comercial⁷, empregando-se a metodologia descrita pelo fabricante.

4.7.3 Haptoglobina

A concentração da haptoglobina sérica foi feita em quadruplicada. Foi avaliada a sua capacidade de ligação às moléculas de meta-hemoglobina. Foi utilizada a técnica de Jones e Mould, (1984) adaptada por Bastos et al. (2013). Para tanto, foi utilizado um soro controle com concentração conhecida de haptoglobina (59 mg/dL), sendo a curva padrão preparada em diluição seriada (1:20 a 1:1280, partindo do volume inicial de 20 µL). As amostras de soro (10 µL) foram diluídas em 90 µL de solução fisiológica, sendo adicionados posteriormente 50 µL de solução de meta-hemoglobina bovina (30 mg/dL). A placa foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz durante 10 minutos, onde foram adicionados 150 µL do substrato guaiacol e 50 µL de peróxido de hidrogênio a 0,02 molar, aguardando-se novamente dez minutos para a reação. A determinação da concentração da haptoglobina sérica foi calculada por regressão linear, após leitura

⁵ ABC Vet®-ABX™

⁶ Modelo Daytona, Randox Laboratories Ltd., Co. Antrim, UK

⁷ Ferro UIBC, Randox®, nº cat. 357599

espectrofotométrica da absorbância em leitor de microplacas e comprimento de onda de 450 nm.

4.7.4 Produção das espécies reativas de oxigênio

A) Separação dos leucócitos sanguíneos

O processos desta etapa foram realizados dentro de fluxo laminar estéril (figura 7a). Para tanto, foram transferidos 3mL do sangue total obtido em tubos com EDTA, para tubos cônicos estéreis com capacidade de 15mL. A lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 6mL da solução de lise Tris-cloreto amônia (0,01M Tris em 0.85% NH_4Cl , anexo A), e incubadas durante 30 minutos em estufa de CO_2 , a 37°C.

Após a incubação, os tubos cônicos foram centrifugados em 300 x g por 10 minutos 18°C, em seguida, as células foram lavadas em 5mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Anexo B) por duas vezes a 300 x g por 5 minutos 18°C.

Após a última lavagem, o pellet celular foi diluído em 1mL de PBS para a contagem de leucócitos pela prova de exclusão do azul de Tripán (Anexo C). Posteriormente, foram pipetados 50 μL da suspensão celular mais 450 μL de Azul de Tripán solução uso (1:10). Foram pipetados 10 μL desta mistura na câmara de Neubauer, contando-se o número de células vivas e mortas em um quadrante da câmara⁸ (figura 7ab). A suspensão celular foi ajustada para 3×10^6 células/mL em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) sem fenol vermelho⁹ suplementado (Anexo D).

⁸ Número de células vivas/quadrante x Fator de diluição x fator da Câmara de Neubauer (10^4) x diluição Azul Tripán

⁹ RPMI 1640 sem fenol vermelho, Sigma®

Figura 7 - Fluxo laminar estéril (a); avaliação da viabilidade celular pela prova de exclusão de Azul de Tripán – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2016).

B) Mensuração de espécies reativas de oxigenio (EROS)

Cem microlitros (100 μ L) de meio RPMI sem fenol vermelho suplementado foram distribuídos em quadruplicatas em placa estéril de 96 poços¹⁰ fundo chato como controle negativo; 100 μ L de suspensão celular para mensuração de EROS basal; 100 μ L de suspensão celular com 10 μ L de 10^{-6} *Phorbol Myristate Acetate*¹¹ (PMA) para mensuração de EROS com estimulação celular.

Por fim, com a luz apagada foram adicionados 10 μ L de DHR-123¹² (Dihydrorhodamine-123) a 10mM em todos os poços para emissão das fluorescências, exceto na coluna contendo apenas meio de cultivo celular. As placas eram mantidas em estufa de CO₂ a 5% por 2 horas a 37°C, e posteriormente avaliadas para a forma fluorescente. A fluorescência foi medida utilizando o leitor de placas SpectraMax¹³, com excitação ocorrendo a 485 nm e emissão a 538 nm.

O valores foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (*Arbitrary fluorescence units*- AFU), a atividade de EROS induzida foi comparada entre experiências gerando uma razão de resposta (RRTIO), em que razão RRTIO= média

¹⁰ 96-well flat bottom plate, Falcon®, nº cat. 353072

¹¹ PMA, P8139, Sigma®

¹² DHR-123, R22420, Molecular Probes®

¹³ SpectraMax® M5, GMI, Inc., Albertville, MN

de AFU por atividade estimulada de EROS - média de AFU por atividade endógena/
média de AFU por atividade endógena.

Quadro 2 - Preenchimento da placa de 96 poços fundo chato para a mensuração da produção de EROS pelas células sanguíneas de novilhas vacinadas - São Paulo - 2017

	1	2	3	4	5	6	7-12
A	Meio	Meio+DHR	Célula+DHR	Célula + PMA +DHR 123	-	-	-
B	Meio	Meio+DHR	Célula+DHR	Célula + PMA +DHR 123	-	-	-
C	Meio	Meio+DHR	Célula+DHR	Célula + PMA +DHR 123	-	-	-
D	Meio	Meio+DHR	Célula+DHR	Célula + PMA +DHR 123	-	-	-
E-H	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: Meio: 100µL RPMI sem fenol suplementado; Meio + DHR-123: 100µL RPMI sem fenol suplementado + 10µL de DHR-123; Célula+DHR: 100µL suspensão celular + 10µL de DHR-123; Célula + PMA + DHR-123: 100µL suspensão celular + 10µL de DHR-123 + 10µL de PMA.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Todas as variáveis foram avaliadas quanto à distribuição em relação à curva gaussiana pela função *Guided Data Analyses*. Alguns dados não apresentaram distribuição normal e foram submetidos a uma transformação logarítmica por $\log_{10}$, raiz quadrada ou inversa para obter uma distribuição normal das variáveis .

As variáveis foram testadas quanto aos efeitos fixos dos tratamentos (Halum, Oleosa, Prezent A e Solução Salina) e dias (0, 6, 24, 48, 72 e 168h), assim como a interação dos efeitos tratamento versus dia por meio de procedimento MIXED (PROC-mixed, SAS), com teste post hoc Least Significant Difference (LSD). Os modelos foram testados conforme as estruturas de covariância, utilizando critério *Akaike Information Criterion* (AIC).

No caso onde ocorreram as transformações, o P apresentado diz respeito aos testes relacionados com os valores transformados, enquanto os valores descritos são reais. As médias e desvios padrões utilizados foram referentes ao dados originais.

As análises foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (*).

5 RESULTADOS

5.1 RESPOSTA IMUNE INATA

A resposta imune inata foi avaliada por meio de hemograma, dosagem de haptoglobina, ferro e mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio.

5.1.2 Eritrograma

Os valores médios em relação ao eritrograma das novilhas antes (0h) e após a 1ª dose, assim como o *booster* (2ª dose) das vacinas contendo diferentes tipos de adjuvantes estão dispostos nas tabelas 2 e 3, e figura 8.

Os valores de He ($\times 10^6/\mu\text{L}$), HGB(g/dL) e Hto (%) foram semelhantes entre os tratamentos ($P \leq 0,141$), dias ($P \leq 0,352$), assim como Trt x dia ($P \leq 0,889$) após a 1ª aplicação das vacinas (Tabela 1). Em relação à 2ª dose, observou-se diferenças entre os grupos para He ($P=0,009$) e HGB ($P=0,028$) no momento 168h. Salina apresentou um menor número de He ($5,47 \times 10^6/\mu\text{L}$) em relação a Present A ($6,70 \times 10^6/\mu\text{L}$). O grupo Salina também apresentou menores teores de HGB (9,42 g/dL) comparado aos grupos que receberam a vacina oleosa (10,40 g/dL) e Present A (10,85 g/dL) às 168h após a 2ª dose. Após a aplicação da 2ª dose não foi possível detectar diferenças entre dias ($P \leq 0,374$), assim como Trt x dia ($P \leq 0,542$).

Os valores de VCM (fl) e HCM (pg) não apresentaram efeito do tratamentos ($P=0,331$; $P=0,258$, respectivamente), dia ($P=0,088$; $P=0,236$, respectivamente) após a aplicação da 1ª dose das vacinas, nem interação Trt x dia ($P=1,000$; $P=1,000$, respectivamente). Os valores de CHCM (g/dL) e PLAQ ($\times 10^3/\mu\text{L}$) foram semelhantes entre os tratamentos ($P \leq 0,365$), Trt x dia ($P \leq 0,433$), porém diferentes entre os dias ($P \leq 0,000$) após a aplicação da 1ª dose das vacinas. Em relação à 2ª dose, os valores de CHCM foram iguais entres as vacinas ($P=0,176$) e interação Trt x dia ($P=0,221$); já entre os dias houveram diferenças ($P=0,000$), com elevação na concentração de CHCM. Após a 1ª dose a concentração de PLAQ apresentada por novilhas do grupo

Oleosa ($333 \times 10^3/\mu\text{L}$) foram maiores que o grupo controle ($168 \times 10^3/\mu\text{L}$) às 6h após a 1ª dose ($P=0,000$) e após *booster* observou-se diferenças entre os grupos para as PLAQ ($P=0,010$) no momento 72h, salina apresentou um menor número de PLAQ ($157 \times 10^3/\mu\text{L}$) em relação a Oleosa ($241 \times 10^3/\mu\text{L}$); porém não entre os dias ($P=0,968$), assim como Trt x dia ($P=0,999$).

Os valores médios em relação a mensuração de ferro ($\mu\text{M/L}$) no soro de novilhas vacinadas e controle, assim como as diferenças entre os grupos e tempos estão apresentados na tabela 2, e figura 8.

As concentrações férricas apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P=0,000$), porém não houve variação em relação aos dias ($P=0,084$) e interação entre Trt x dia ($P=0,623$) após a aplicação da 1ª dose. Em relação à 2ª dose, observou-se diferenças entre tratamentos ($P=0,000$) e dias ($P=0,000$), porém não houve interação entre Trt x dia ($P=0,117$). Antes de aplicar as vacinas, os teores de ferro sérico eram iguais entre os grupo (0h), porém entre 6 e 72h os valores eram menores nos grupos vacinados em relação à salina. Interessante observar que os efeitos da vacina Halum sobre os teores de ferro foram mais sutis, enquanto que a vacina contendo Prezent A induziu maior intensidade na queda do ferro sérico. A análise no tempo revelou pequenas oscilações nos teores de ferro para o grupo salina, observando-se o menor valor às 6h e maior valor às 48h. Quando verificamos os valores ao longo dos dias, os grupos Halum e Oleosa apresentaram valores menores e constantes entre 0 e 24h, observando-se aumento nos momentos subsequentes entre 48h até 168h. O grupo imunizado com a vacina contendo Prezent A apresentou queda intensa nos teores de ferro sérico entre 6 e 48h, observando-se leve aumento nos momentos subsequentes entre 72 e 168h.

Tabela 2 – Valores de “P” dos efeitos de tratamento, dia e a interação entre tratamento x dia no eritrograma de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variáveis	1ª dose - P - value			2ª dose - P - value		
	Trat	Dia	Trt x Dia	Trat	Dia	Trt x Dia
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0,141	0,503	0,992	0,009	0,907	0,989
HGB (g/dL)	0,213	0,964	0,889	0,028	0,374	0,951
Hto (%)	0,153	0,352	0,978	0,166	0,411	0,542
VCM (fl)	0,331	0,969	1,000	0,088	0,973	1,000
HCM (pg)	0,258	0,812	1,000	0,236	0,311	1,000
CHCM (g/dL)	0,365	0,000	0,433	0,176	0,000	0,221
PLAQ ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,000	0,365	0,433	0,010	0,968	0,999
FERRO ($\mu\text{M/L}$)	0,000	0,084	0,623	0,000	0,000	0,117

Fonte: (BACCILLI, C. C., 20

Tabela 3 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação ao eritrograma e concentração de ferro sérico de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

		1ª dose				2ª dose			
Variáveis		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
He (x10 ⁶ /μL)	6h	6,59	6,10	6,39	5,88	6,23	6,40	6,54	6,08
	24h	6,54	6,36	6,18	6,14	6,08	6,11	6,32	5,85
	48h	6,33	5,85	6,12	5,46	6,07	6,17	6,28	5,76
	72h	6,16	6,26	6,22	5,96	6,14	6,40	6,32	5,84
	168h	6,42	6,32	6,37	6,19	6,00 ^{AB}	6,51 ^{AB}	6,70 ^A	5,47 ^B
HGB (g/dL)	6h	9,97	9,24	9,67	9,28	9,71	9,74	10,34	9,78
	24h	9,80	9,58	9,44	9,70	9,69	9,55	10,03	9,43
	48h	9,88	9,06	9,55	8,68	9,64	9,69	9,97	9,55
	72h	9,46	9,38	9,43	9,60	9,74	10,00	10,05	9,77
	168h	9,73	9,52	9,42	10,10	9,73 ^{AB}	10,40 ^A	10,85 ^A	9,42 ^B
Hto (%)	6h	30,96	29,51	29,91	28,73	29,86	29,95	30,87	30,38
	24h	30,31	29,60	29,15	30,32	28,24	28,42	29,88	29,23
	48h	30,14	27,42	29,28	28,09	28,61	28,41	29,31	28,30
	72h	28,87	29,00	29,26	29,22	29,22	29,70	29,66	29,23
	168h	30,54	29,79	29,75	31,35	28,46	30,20	31,40	24,89
VCM (fl)	6h	47,43	45,93	46,79	48,69	48,18	47,51	46,31	50,63
	24h	47,65	46,84	47,38	49,16	47,19	47,28	47,77	48,76
	48h	49,55	47,14	46,51	49,29	47,69	46,10	47,24	49,56
	72h	48,35	46,69	47,31	48,81	48,18	47,21	47,44	50,85
	168h	47,30	47,73	47,25	50,78	47,78	47,21	47,61	49,89
HCM (pg)	6h	15,30	15,65	15,29	16,54	15,66	15,35	15,30	16,34
	24h	15,41	15,19	15,33	15,92	16,05	15,78	15,97	16,32
	48h	16,37	15,78	15,99	16,57	16,02	15,90	15,95	16,71
	72h	16,21	15,27	15,16	16,33	15,97	15,79	16,01	16,25
	168h	15,28	15,30	14,89	16,80	16,28	16,20	16,40	17,26
CHCM (g/dL)	6h	32,18 ^{ab}	32,57 ^{ab}	32,25 ^{ab}	32,42 ^{abc}	32,50 ^a	32,48 ^a	32,34 ^a	32,18 ^a
	24h	32,28 ^{ab}	32,33 ^a	32,35 ^{ab}	31,95 ^a	34,29 ^b	33,59 ^b	33,62 ^b	32,25 ^a
	48h	32,73 ^a	33,00 ^b	32,64 ^a	32,80 ^{bc}	33,69 ^{bc}	34,06 ^{bc}	33,95 ^{bc}	33,72 ^b
	72h	32,72 ^a	32,33 ^a	32,14 ^{ab}	33,00 ^c	33,34 ^c	33,62 ^b	33,82 ^b	33,38 ^{bc}
	168h	31,84 ^b	31,91 ^c	31,85 ^b	32,18 ^{ab}	34,18 ^b	34,43 ^c	34,53 ^c	34,72 ^d
PLAQ (x10 ³ /μL)	6h	214,33 ^{AB}	333,30 ^A	254,20 ^{AB}	168,17 ^B	246,56	221,00	208,80	188,00
	24h	263,67	251,60	235,20	251,33	225,33	227,30	209,10	155,67
	48h	205,67	275,60	193,70	259,67	204,89	228,60	191,50	178,33
	72h	220,00	253,70	285,00	264,67	219,67 ^{AB}	241,00 ^A	201,60 ^{AB}	157,17 ^B
	168h	238,11	266,00	235,00	252,50	207,89	246,00	237,70	163,00
FERRO (μM/L)	0h	28 ^A	26 ^{AB}	23 ^B	32	23 ^{Ab}	27 ^{Aab}	25 ^{Aa}	29 ^{Aab}
	6h	27 ^{AB}	26 ^B	21 ^B	35	20 ^{ABb}	16 ^{Bc}	14 ^{Bb}	25 ^{Ab}
	24h	29 ^{AB}	23 ^B	15 ^C	32	21 ^{ABb}	19 ^{Bbc}	12 ^{Cb}	30 ^{Aab}
	48h	30 ^{AB}	26 ^{AB}	23 ^B	32	33 ^{ABa}	27 ^{Bab}	14 ^{Cb}	38 ^{Aa}
	72h	28 ^{AB}	24 ^{BC}	21 ^C	33	27 ^{ABab}	26 ^{ABb}	24 ^{Ba}	33 ^{Aab}

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: h: horas; He: hemácias; HGB: hemoglobina; Hto: hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PLAQ: plaquetas; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos do mesmo tratamento. Letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos. Foram consideradas significativas quando P ≤ 0,05

Figura 8 - Valores médios e desvio padrão em relação as concentrações de He, HGB, Hto e ferro no sangue das novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

5.1.3 Leucograma

Os valores médios relativos e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) em relação aos leucócitos totais, linfócitos, monócitos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos obtidos por meio do leucograma de novilhas vacinadas e controle, assim como as diferenças entre os grupos e tempos estão apresentados nas tabelas 4 e 5, e figuras 9 a 12.

Para os valores de LEUCO ($\times 10^3/\mu\text{L}$) após a 1ª dose não foi observado efeito de tratamento, nem interação Trt x dia. Porém, houve efeito do dia, onde o grupo que recebeu a vacina oleosa apresentou maior número de LEUCO em 6h. Em contrapartida, após 6h da 2ª dose houve diferença entre os tratamentos ($P=0,001$), sendo grupo Prevent A maior ($18,36 \times 10^3$) que o grupo Salina ($13,50 \times 10^3$).

Os linfócitos absolutos durante a 1ª e 2ª dose apresentaram dinâmica semelhantes entre os grupos ($P=0,100$ e $0,777$), dias ($P=0,805$ e $0,892$) e Trt x dia ($P=0,999$ e $0,967$), respectivamente. Todavia, o perfil linfocitário relativo (%) tiveram efeito no tratamento na 1ª ($P=0,031$) e 2ª dose ($P=0,000$), assim como ao longo dos dias ($P=0,001$ e $0,000$). O grupo de novilhas Halum apresentou maiores valores de linfócitos relativos (%) 24h após a 1ª e 2ª dose, sendo importante enfatizar que este grupo teve uma linfocitose precoce quando comparada aos demais grupos.

O perfil de monócitos foram semelhantes entre os grupos estudados, apenas entre os momentos da 1ª dose ($P=0,000$) o grupo Halum às 24h se destacaram superiormente ($1,99 \times 10^3/\mu\text{L}$) do restante dos tempos. As porcentagens foram diferentes entre grupos ($P=0,010$) e tempos ($P=0,000$) apenas após 1ª dose, isto porque as novilhas controles apresentaram maiores valores em 6h e 24h em relação aos grupos vacinados; posteriormente Halum em 72h se sobressaiu pois Salina, Prevent A e Oleosa tiveram uma baixa nos valores de forma gradual até 168h.

Valores de basófilos se diferenciaram entre os grupos ($P=0,001$) após a 1ª dose, onde no tempo 6h Prevent A tiveram números inferiores ($0,41 \times 10^3/\mu\text{L}$) à Salina ($1,19 \times 10^3/\mu\text{L}$). Quando as interações Trt x Dia foi avaliado não houve diferenças. Por outro lado, em % foi possível observar perfis semelhantes entre os grupos após 1ª dose. Durante a 2ª dose ($P=0,012$) houveram diferenças relativo a dois picos, primeiro às 24h para novilhas do grupo Salina; em seguida às 48h para os grupos Prevent A e Oleosa, resultando assim em efeito de tempo ($P=0,014$).

Os neutrófilos absolutos e relativos foram diferentes quanto aos grupos ($P=0,001$ e $0,000$) e tempos ($P=0,001$ e $0,001$) em relação a 1ª dose, e também após *booster* ($P=0,019$ e $0,000$) e ao longo do tempo ($P=0,048$ e $0,000$). Todos os grupos tiveram diminuição gradativa, com maiores valores às 6h após a vacinação e posteriormente queda. O grupo Prezent A apresentou-se com maiores valores de neutrófilos em relação as novilhas que receberam vacina Halum, Oleosa e Salina.

Os eosinófilos absolutos e relativos foram diferentes entre os grupos ($P=0,001$ e $0,000$) e tempos após 1ª dose ($P=0,001$ e $0,002$), com detecções de valores superiores para o grupo controle, principalmente com 24h e 72h. Na segunda dose entre os grupos apenas os valores relativos foram distintos ($P=0,018$), mostrando que às 6h o grupo Salina foi maior (7,16%) que novilhas vacinadas, ao contrário em 72h onde grupo Salina apresentou seus menores valores (5,33%) e se estabilizou até 168h momento que Halum (7%) foi maior que os demais.

Tabela 4 - Valores de “*P*” dos efeitos de tratamento, dia e a interação entre tratamento x dia no leucograma de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variáveis	1ª dose - <i>P</i> - value			2ª dose - <i>P</i> - value		
	Trat	Dia	Trt x Dia	Trat	Dia	Trt x Dia
LEUCO ($10^3/\mu\text{L}$)	0,101	0,026	0,930	0,001	0,000	0,999
LINF ($10^3/\mu\text{L}$)	0,100	0,805	0,999	0,777	0,892	0,967
MONO ($10^3/\mu\text{L}$)	0,297	0,000	0,776	0,195	0,103	0,987
BAS ($10^3/\mu\text{L}$)	0,001	0,098	0,769	0,959	0,200	0,945
NEUTR ($10^3/\mu\text{L}$)	0,001	0,001	0,797	0,019	0,048	0,462
EOS ($10^3/\mu\text{L}$)	0,001	0,001	0,270	0,223	0,001	0,668
LINF (%)	0,031	0,001	0,885	0,000	0,000	0,519
MONO (%)	0,010	0,000	0,346	0,734	0,388	0,983
BAS (%)	0,370	0,553	0,756	0,012	0,014	0,231
NEUTR (%)	0,000	0,001	0,267	0,000	0,000	0,185
EOS (%)	0,000	0,002	0,617	0,000	0,018	0,959

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Tabela 5 - Valores médios absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) obtidos no leucograma de novilhas Holandesas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variáveis		1ª dose				2ª dose			
		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
LEUCO TOTAL ($10^3/\mu\text{L}$)	6h	16,63	17,22 ^a	16,07	13,47	15,89 ^{ABa}	15,80 ^{ABa}	18,36 ^{Aa}	13,50 ^{Ba}
	24h	14,64	13,66 ^b	16,04	13,60	13,84 ^a	12,58 ^b	14,40 ^b	11,80 ^{ab}
	48h	14,43	12,19 ^b	14,13	11,63	13,73 ^a	12,23 ^b	14,36 ^b	11,45 ^{ab}
	72h	13,92	13,41 ^b	14,30	12,08	13,51 ^a	12,21 ^b	14,11 ^b	10,60 ^{ab}
	168h	13,70	13,21 ^b	14,30	14,05	12,07 ^{ABb}	12,20 ^{ABb}	13,45 ^{Ab}	9,62 ^{Bb}
LINF ($10^3/\mu\text{L}$)	6h	7,76	7,01	6,58	6,98	8,69	6,99	6,73	7,42
	24h	8,43	6,91	6,33	6,13	8,65	7,01	5,96	6,65
	48h	8,25	6,59	7,39	6,48	8,40	6,51	7,08	6,71
	72h	8,09	7,37	7,25	6,82	8,45	6,96	7,22	5,98
	168h	8,11	7,57	7,67	7,45	7,78	6,71	8,19	5,93
MONO ($10^3/\mu\text{L}$)	6h	2,11 ^a	1,80	1,72 ^{ab}	2,06 ^a	1,40	1,32	1,52	1,58
	24h	2,06 ^a	1,81	1,99 ^a	2,22 ^a	1,00	1,21	1,14	0,97
	48h	1,86 ^{ab}	1,44	1,71 ^{ab}	1,43 ^b	1,31	1,23	1,25	1,09
	72h	1,85 ^{ab}	1,35	1,59 ^a	1,23 ^b	1,35	1,24	1,51	1,05
	168h	1,31 ^b	1,38	1,24 ^b	1,31 ^b	1,02	1,17	1,33	0,76
BAS ($10^3/\mu\text{L}$)	6h	0,68 ^{AB}	0,68 ^{AB}	0,41 ^B	1,19 ^A	0,73	0,90	0,60	1,11
	24h	0,86	0,94	0,84	1,36	1,01	1,10	1,28	1,27
	48h	0,53	0,74	0,98	1,02	1,19	1,25	1,29	0,70
	72h	0,29	0,80	0,65	0,99	1,00	1,08	1,0	0,89
	168h	0,46	0,70	0,63	0,69	0,87	0,68	0,89	0,65
NEUTR ($10^3/\mu\text{L}$)	6h	5,80 ^{ABa}	7,38 ^{Aa}	7,28 ^{ABa}	3,26 ^{Bab}	5,17 ^{BCa}	6,54 ^{Ba}	9,10 ^{Aa}	3,43 ^{Cab}
	24h	3,21 ^{Bb}	3,80 ^{Bb}	6,92 ^{Ab}	3,60 ^{Bab}	2,92 ^{Bb}	3,50 ^{Bb}	5,83 ^{Abc}	2,84 ^{Bab}
	48h	3,70 ^{Ab}	3,16 ^{Ab}	3,87 ^{Ac}	2,63 ^{Ab}	2,91 ^{Ab}	3,20 ^{Ab}	4,34 ^{Ac}	2,94 ^{Aab}
	72h	3,54 ^{ABb}	3,47 ^{ABb}	4,68 ^{Ac}	2,54 ^{Bb}	2,63 ^{Bb}	3,16 ^{ABb}	4,17 ^{Ac}	2,62 ^{Bb}
	168h	3,68 ^{Ab}	3,39 ^{Ab}	4,66 ^{Ac}	4,60 ^{Ab}	2,49 ^{ABb}	3,70 ^{ABb}	3,92 ^{Ac}	2,16 ^{Bb}
EOS ($10^3/\mu\text{L}$)	6h	0,54 ^{Babc}	0,60 ^B	0,42 ^{Bb}	1,08 ^{ABa}	0,75 ^{abc}	0,78	0,96 ^{ab}	0,96 ^{ab}
	24h	0,72 ^{Babc}	0,78 ^B	0,74 ^{Bab}	1,40 ^{Aa}	1,04 ^a	0,98	1,39 ^a	1,12 ^{ab}
	48h	0,45 ^{bc}	0,65	1,10 ^{ab}	1,00 ^{ab}	1,08 ^a	0,99	1,44 ^a	0,60 ^b
	72h	0,29 ^{Bc}	0,73 ^{AB}	0,70 ^{Bab}	1,40 ^{Aa}	0,98 ^{ab}	0,99	1,06 ^{ab}	0,78 ^{ab}
	168h	0,40 ^{bc}	0,59	0,68 ^{ab}	0,57 ^b	0,78 ^{abc}	0,68	0,81 ^{ab}	0,60 ^b
LINF (%)	6h	46,33 ^a	41,70 ^a	42,00 ^{ab}	50,33 ^{abc}	51,78 ^{ABa}	44,70 ^{BCa}	36,70 ^{Ca}	55,33 ^A
	24h	56,56 ^{Aab}	49,30 ^{Bab}	39,50 ^{Ca}	44,17 ^{BCa}	61,44 ^{Aab}	56,10 ^{Abc}	41,20 ^{Bab}	57,33 ^A
	48h	57,22 ^{ab}	54,20 ^b	52,30 ^c	56,00 ^{bc}	59,44 ^{ab}	52,90 ^{abc}	49,40 ^{bc}	59,00
	72h	58,56 ^b	55,90 ^b	50,80 ^{bc}	57,33 ^{bc}	61,11 ^{ab}	57,20 ^c	51,70 ^c	56,67
	168h	56,00 ^{ab}	56,40 ^b	53,60 ^c	55,67 ^{ab}	63,33 ^b	55,30 ^c	58,90 ^c	63,17
MONO (%)	6h	12,44 ^{ABab}	10,30 ^{Aa}	11,20 ^{Aab}	15,83 ^{Cab}	9,22	8,70	8,70	11,33
	24h	13,89 ^{ABCa}	13,80 ^{ABCb}	13,00 ^{ABCa}	16,67 ^{Cb}	7,33	9,90	7,70	8,00
	48h	12,44 ^{ab}	11,50 ^{ab}	11,80 ^{ab}	12,33 ^{acd}	9,56	10,30	8,60	9,67
	72h	13,22 ^{Aab}	9,40 ^{Ba}	11,00 ^{ABab}	10,17 ^{ABcd}	9,78	9,90	10,90	9,67
	168h	9,67 ^b	10,90 ^{ab}	9,40 ^b	9,67 ^d	8,78	9,80	9,30	8,00
BAS (%)	6h	0,56 ^a	0,50	0,40	0,67	0,45 ^{Aa}	0,50 ^{ABa}	0,30 ^{ABa}	0,83 ^{Ba}
	24h	1,11 ^b	0,90	0,50	0,61	0,67 ^{Aab}	0,70 ^{Aa}	0,60 ^{Aa}	1,67 ^{Ba}
	48h	0,37 ^a	0,80	0,30	0,83	0,44 ^{Aa}	1,80 ^{Bb}	1,50 ^{Bb}	1,00 ^{ABa}
	72h	0,67 ^a	0,90	0,70	0,67	1,33 ^b	0,70 ^a	1,00 ^{ab}	1,50 ^a
	168h	0,67 ^a	0,60	0,30	0,96	0,44 ^{Aa}	1,10 ^{ABab}	0,70 ^{ABa}	1,50 ^{Ba}
NEUTR (%)	6h	36,80 ^{Aa}	42,81 ^{Aa}	43,40 ^{Aa}	25,00 ^B	35,00 ^{Bab}	41,36 ^{ABa}	49,50 ^{Aa}	25,33 ^C
	24h	23,80 ^{Bcde}	30,00 ^{Bb}	42,70 ^{Aa}	27,00 ^B	21,70 ^{Bcde}	27,81 ^{Bb}	41,30 ^{Aa}	23,67 ^B
	48h	27,00 ^{abcd}	26,00 ^b	26,90 ^b	22,67	22,40 ^{cde}	27,18 ^b	30,90 ^b	25,00 ^A
	72h	25,70 ^{ABbc}	26,00 ^{ABb}	31,90 ^{Ab}	21,17 ^B	20,10 ^e	25,54 ^b	29,40 ^b	24,33
	168h	30,20 ^{abc}	26,18 ^b	31,60 ^b	29,16	21,30 ^{Bde}	29,00 ^{Ab}	25,20 ^{ABb}	21,66 ^B
EOS (%)	6h	3,30 ^{Bbc}	3,54 ^{Bc}	2,90 ^{Bb}	8,78 ^{Aabc}	5,10 ^{Babc}	4,81 ^{Bbc}	5,00 ^{Bab}	7,16 ^{Aabc}
	24h	5,00 ^{Babc}	5,45 ^{Babc}	4,70 ^{Bab}	9,96 ^{Aab}	8,20 ^{ab}	7,64 ^{ab}	9,10 ^a	9,33 ^{abc}
	48h	3,30 ^{bc}	5,82 ^{abc}	8,20 ^a	8,16 ^{abc}	8,70 ^{Aa}	8,36 ^{Aa}	9,40 ^{Aa}	5,33 ^{BAC}
	72h	2,20 ^{Bc}	5,55 ^{Babc}	5,50 ^{Bab}	10,12 ^{Aa}	8,30 ^a	8,09 ^{ab}	7,10 ^{ab}	7,83 ^{abc}
	168h	3,10 ^c	5,09 ^{abc}	5,50 ^{ab}	5,30 ^{Ac}	7,00 ^{Aabc}	5,91 ^{Babc}	5,80 ^{Bab}	5,67 ^{Bbc}

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: h: horas; LEUCO: leucócitos totais; LINF: linfócitos; MONO: monócitos; BAS: basófilos; NEUTR: neutrófilos; EOS: eosinófilos. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$; Letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

Figura 9 - Valores médios absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) e desvio padrão em relação aos leucócitos totais, linfócitos e monócitos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Figura 10 - Valores médios absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) e desvio padrão em relação aos basófilos, neutrófilos e eosinófilos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Figura 11 - Valores médios relativos (%) e desvio padrão em relação aos linfócitos, monócitos e basófilos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Figura 12 - Valores médios relativos (%) e desvio padrão em relação aos neutrófilos e eosinófilos de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

5.1.4 Haptoglobina

As médias de concentrações obtidas para a haptoglobina sérica (mg/dL) e diferenças entre os grupos e tempos de novilhas Halum, Oleosa, Prezent A e Salina após a 1ª e 2ª dose estão expressos na tabela 6 e figura 13.

Houveram diferenças quanto ao tratamento ($P=0,000$), dia ($P=0,000$) e Trt x dia ($P=0,000$) após a aplicação da 1ª dose. O mesmo comportamento foi observado após o *booster* na comparação entre vacinas ($P=0,000$), dia ($P=0,007$) e Trt x dia ($P=0,000$).

Foi possível observar diferenças entre os grupos experimentais após a 1ª dose, no momento 24h, onde é possível observar as novilhas Prezent A apresentando um quadro acentuado de resposta inflamatória (7,87mg/dL), enquanto que no mesmo período os grupos Halum (1,06 mg/dL), Oleosa (1,34 mg/dL) e Salina (1,80 mg/dL) exibiram-se dentro dos valores basais. Posteriormente, o fenômeno se repete às 48h

para Prezent A (3,71 mg/dL). Nos momentos subsequentes não foram observadas diferenças entre as vacinas, apesar dos valores séricos de HP no Prezent A ainda serem visualmente maiores. Ao longo do tempo após a 1ª dose as novilhas Halum, Oleosa e Salina apresentaram oscilações mínimas, no tempo 24h as médias variaram com valores mínimos 1,06mg/dL para Halum e 1,34mg/dL para Oleosa, mais a diante o ponto mínimo de Salina foi às 72h com valor de 1,21mg/dL. O pico máximo destes 3 grupos foram em 168h para Halum (1,68mg/dL), Oleosa antes da aplicação da vacina 0h apresentou 1,54mg/dL e Salina teve valor máximo de 1,80mg/dL em dois momentos: 24h e 168h.

O perfil inflamatório após o *booster* foi bastante semelhante a 1ª dose, o grupo Prezent A se destaca das outras vacinas novamente às 24h e 48h (4,67 e 5,01 mg/dL), enquanto Halum (1,22 e 1,27 mg/dL), Oleosa (1,74 e 2,20 mg/dL) e Salina (1,210 e 1,19 mg/dL) permanecem no mesmo perfil de concentrações com baixa intensidade. A diferença entre os tempos foi observada apenas para Oleosa e Prezent A, isso porque as novilhas do grupo Oleosa ficaram mais inflamadas às 6h e 72h (2,63 e 2,39 mg/dL) e Prezent A às 24h e 48h (4,67 e 5,01mg/dL). Halum tiveram mínima concentração às 72h (1,15mg/dL) e Salina às 6h (1,01), enquanto as máximas foram vistas às 6h para Halum (1,53mg/dL) e Oleosa às 72h (1,19mg/dL).

Tabela 6 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação a dosagem de haptoglobina (mg/dL) no soro de novilhas de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

		1ª dose				2ª dose			
Grupos		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
Haptoglobina (mg/dL)	0H	1,23	1,54	1,41 ^c	1,58	1,20	2,31 ^{ab}	1,46 ^a	1,04
	6H	1,39	1,36	1,47 ^c	1,57	1,53 ^{AB}	2,63 ^{Aa}	1,69 ^{ABa}	1,01 ^B
	24H	1,06 ^B	1,34 ^B	7,87 ^{Aa}	1,80 ^B	1,22 ^B	1,74 ^{Bab}	4,67 ^{Ab}	1,10 ^B
	48H	1,18 ^B	1,52 ^B	3,71 ^{Ab}	1,56 ^B	1,27 ^B	2,20 ^{Bab}	5,01 ^{Ab}	1,10 ^B
	72H	1,34	1,37	2,07 ^c	1,21	1,15 ^B	2,39 ^{Aab}	1,75 ^{ABa}	1,19 ^{AB}
	168H	1,68	1,51	1,53 ^c	1,80	1,21	1,26 ^b	1,41 ^a	1,16

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: Letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$

Figura 13 - Valores médios e desvio padrão em relação as concentrações de haptoglobina (mg/dL) de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

5.1.5 Produção de espécies reativas de oxigênio

Os valores médios de fluorescência (AFU) e diferenças entre os grupos e tempos relacionados à produção de espécies reativas de oxigênios (EROS) de células não estimuladas, células estimuladas com PMA e as proporções de Response Ratio (RRTIO) estão expressos nas tabela 7 e figura 14.

Em relação as interações após a 1ª e 2ª dose as células não estimuladas foram diferentes apenas ao longo do tempo ($P=0,005$) da 1ª dose; células com PMA foram distintas quanto ao tratamento ($P=0,018$ e $0,002$) e dia ($P=0,015$ e $0,007$); a razão RRTIO foi diferente entre os grupos ($P=0,026$, $P=0,000$), respectivamente.

As células não estimuladas oscilaram entre os tempos, em 1ª dose visto que o pico dos grupos foram em 24h, explanando 843/AFU para novilhas Halum, 923/AFU em Oleosa, 859/AFU para Prezent A e Salina 958/AFU. As fluorescências mínimas foi observada às 72h para Halum (394/AFU), Oleosa (525/AFU), Prezent A (600/AFU) e Salina (490/AFU). Em relação a 2ª dose é perceptível que as novilhas Prezent A e Oleosa expressaram maiores AFU em 24h (1.163) e 72h (1.376), comparadas com Halum (829 e 648), Oleosa (762 e 781) e Salina (794 e 401).

As células estimuladas com PMA mostraram-se com perfis distintos entre os grupos Halum com Salina, que apresentou-se superior em 168h após 1ª dose. Em contrapartida em 2ª dose às 24h os valores expressos pelas novilhas do grupo Salina

(7.768/AFU) e Prezent A (5.053/AFU) foram estatisticamente iguais, entretanto, quando os grupos Halum (4.856/AFU) e Oleosa (4.868/AFU) são comparados ao controle, a intensidade de fluorescência do grupo Salina foi considerada maior. No tempo seguinte às 48h o cenário se inverte e Prezent A (3.771/AFU) apresenta-se com a fluorescência menor que o restante dos grupos Halum (5.162/AFU), Oleosa (4.967/AFU) e Salina (7418/AFU).

Em relação às proporções de RRTIO foi possível observar diferença entre os tratamentos no tempo 6h e 168h após a 1ª dose em novilhas Salina (8,56 e 9,19) sendo superior a em relação Halum (4,80 e 3,50), Oleosa (4,10 e 6,63) e Prezent A (5,66 e 4,84). Na 2ª dose novamente os animais vacinados tiveram baixos valores, desta vez em 24h e 72h, assim Salina expressaram RRTIO mais elevados (8,37 e 10,78), comparado à Halum (4,27 e 4,91), Oleosa (4,78 e 5,16) e Prezent A 4,27 e 4,26).

Tabela 7 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação a produção de espécies reativas de oxigênios (EROS) de células não estimuladas, células estimuladas com PMA e RRTIO de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

		1ª dose				2ª dose			
Grupos		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
Células (AFU)	6H	628 ^{ab}	842 ^{abc}	486 ^b	479 ^{cde}	1030	813	1022	770
	24H	843 ^{ab}	923 ^{ab}	859 ^{ab}	958 ^{ab}	829	762	1163	794
	48H	631 ^{ab}	741 ^{abc}	678 ^{ab}	658 ^{bcd}	879	1041	1077	1041
	72H	394 ^b	525 ^{bc}	600 ^{ab}	490 ^{de}	648	781	1376	402
	168H	662 ^{ab}	468 ^c	693 ^{ab}	473 ^{cde}	1002	548	582	595
Células estimuladas com PMA (AFU)	6H	3.645 ^{abc}	4.294	3.239	4.574 ^{bc}	5.551 ^a	4.819 ^a	4.965 ^a	6.335 ^{ab}
	24H	4.445 ^{abc}	5.336	4.524	5.217 ^{bc}	4.856 ^{Bab}	4.868 ^{Ba}	5.053 ^{ABa}	7.768 ^{Aa}
	48H	3.265 ^{abc}	4.139	3.341	4.444 ^c	5.162 ^{Aab}	4.967 ^{ABa}	3.771 ^{Ba}	7.418 ^{Aa}
	72H	2.326 ^c	3.238	3.157	3.633 ^c	3.836 ^{abc}	3.848 ^a	3.754 ^a	4.733 ^{bc}
	168H	2.979 ^{Abc}	3.569 ^{AB}	4.044 ^{AB}	4.820 ^{Bbc}	4.022 ^{abc}	4.423 ^a	3.331 ^a	5.208 ^{bc}
RRTIO	6H	4,80 ^B	4,10 ^{AB}	5,66 ^{AB}	8,56 ^A	4,39	4,92	3,86	7,22 ^{abc}
	24H	4,27	4,78	4,27	4,10	4,86	5,39	6,09	8,37 ^{ab}
	48H	4,17	4,59	3,93	5,75	4,87 ^{AB}	3,77 ^{AB}	3,35 ^B	6,12 ^{Aabc}
	72H	4,91	5,16	4,26	6,42	4,92 ^{AB}	5,00 ^{AB}	1,73 ^B	10,78 ^{Aa}
	168H	3,50 ^B	6,63 ^{AB}	4,84 ^B	9,19 ^A	3,01 ^B	7,07 ^{AB}	4,72 ^{AB}	7,75 ^{Aabc}

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: AFU= Unidades arbitrárias de fluorescência; RRTIO= média de AFU por atividade estimulada de EROS - média de AFU por atividade endógena/ média de AFU por atividade endógena. Letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$

Figura 14 - Valores médios e desvio padrão em relação a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) de células não estimuladas e células estimuladas com PMA de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou a resposta inflamatória sistêmica induzida pelas vacinas reprodutivas inativadas contendo diferentes adjuvantes em novilhas Holandesas, por meio do hemograma, produção de espécies reativas de oxigênio, dosagem de haptoglobina e dosagem de ferro.

Em relação ao número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), as novilhas vacinadas e controle apresentaram médias semelhantes para os componentes do eritrograma após a 1ª dose da vacina, por outro lado verificou-se maior número de He e HGB no sangue de novilhas vacinadas após a 2ª dose das três vacinas comerciais, especialmente nos grupos Prezent A e oleosa. Além disso, o número de plaquetas foi maior nas novilhas vacinadas às seis horas após a 1ª dose da vacina e às 72 horas após o *booster*. Este fenômeno ainda não foi relatado na literatura com uma resposta à vacinação, entretanto pode-se hipotetizar que as citocinas pró-inflamatórias poderia atuar na medula aumentando a eritropoiese como observado para a linhagem de células mielóides. Outra possibilidade seria o aumento da contração esplênica mediada pelo cortisol e liberação de epinefrina em casos de estresse. O baço sequestra de 1/4 a 2/3 do total de plaquetas, liberando essas células para o compartimento circulante com intuito de elevar o número de eritrócitos para a corrente sanguínea e aumentando a oferta de oxigênio em situações de estresse (PALUDO et al., 2002; TORNQUIST; RIGAS, 2010; SILVA et al., 2012).

A importância dos eritrócitos na resposta vacinal tem sido estudada. Acredita-se que o aprisionamento e transporte de substâncias dentro dos eritrócitos, aumenta o potencial de estabilidade e entrega do antígeno para as APC's. O Prezent A é um adjuvante de nanopartículas que poderia por via eritrocitária carrear os antígenos internalizados para os macrófagos que englobam o antígeno indiretamente no momento de ingestão dos eritrócitos senescentes no baço (PAN et al., 2017).

As nanopartículas formadas pela mistura composta do adjuvante Prezent A são de aproximadamente 30-40nm de diâmetro, o que permite uma maior mobilidade para a drenagem aos gânglios linfáticos, além de estabilidade local, aumentando assim absorção do antígeno e apresentação para as células dendríticas, este conjunto de fatores aumentam as chances de indução de resposta imune celular e humoral (SALIBA

et al., 2017). Pesquisas evidenciaram que partículas de adjuvantes que medem entre 200 nm a 1 µm são considerados do tamanho ideal para que ocorra a fagocitose, apresentação de antígeno e a estimulação das respostas imunes por meio da secreção de citocinas (SHARP et al., 2009; KURODA; COBAN; ISHII, 2013)

As concentrações séricas de ferro nas novilhas controle eram maiores que às aquelas vacinadas, especialmente em relação ao grupo Prezent A entre seis e 48 horas após a vacinação. A menor disponibilidade do ferro sérico nas novilhas vacinadas pode ser explicada pela ação da hepcidina para limitar a multiplicação de microrganismos extracelulares ferro-dependentes (MARIN, 2014; GANZ, NEMETH, 2012). A hepcidina é considerada um peptídeo antimicrobiano mediador da imunidade inata sintetizado pelos hepatócitos, cuja síntese é regulada pela IL-6, que induz a transcrição do gene da hepcidina por meio da ativação do fator de transcrição STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*). No interior da célula, o ferro absorvido liga-se à ferritina dirigindo-se à membrana basolateral, onde está localizada a ferroportina, presente em enterócitos, macrófagos e hepatócitos, que é uma proteína necessária para o transporte do ferro para o plasma. A hepcidina possui a função de se ligar à ferroportina, regulando a exportação do ferro para o plasma. Quando as concentrações de hepcidina estão baixas, as moléculas de ferroportina são expostas na membrana plasmática e exportam ferro. Quando as concentrações de hepcidina aumentam, esta se liga às moléculas de ferroportina induzindo sua internalização e degradação, e o ferro se torna indisponibilizado progressivamente (DONOVAN et al., 2005; LEMOS et al., 2010; ANTUNES; CANSIANI, 2016).

A determinação da concentração de haptoglobina permite afirmar que o pico da inflamação pós-vacinal ocorreu entre 6h e 48h após a vacinação com Prezent A, Halum e Oleosa. Foi possível observar que as novilhas Prezent A apresentaram maior intensidade de resposta inflamatória que as demais vacinas entre 24 e 48 horas após a 1ª e 2ª doses.

A haptoglobina é a proteína de fase aguda mais indicada para a mensuração da inflamação em bovinos. A produção desta proteína também é mediada pelas citocinas pró-inflamatórias oriunda da resposta imune inata. A Hp pode ser usada como um indicador quantitativo da infecção, inflamação, lesão tecidual e estresse (MURRATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

A imunização de bovinos com vacinas multivalentes contra *Clostridium* também aumentou significativamente a concentração sérica de haptoglobina entre 24h e 48h

após a imunização com vacina contendo saponina em emulsão aquosa (STOKKA et al., 1994).

Ferreira et al. (2016) avaliaram as concentrações de haptoglobina em vacas vacinadas contra o vírus da Febre Aftosa contendo adjuvante oleoso. Amostras de soro foram coletadas em momentos semelhantes deste estudo: 0, 24, 72, 120 e 168h após a administração da vacina. A concentração de haptoglobina plasmática também apresentou pico sérico às 24h após a aplicação da vacina. Os autores atribuíram o aumento da haptoglobina à intensa reação local induzida pela vacina contra febre aftosa, devido a presença de adjuvantes oleosos (Leal et al., 2014). No Brasil, algumas composições das vacinas contra Febre Aftosa contêm saponina como agente imunoestimulante além da emulsão oleosa.

Rodrigues et al. (2015) avaliaram a resposta inflamatória em 18 novilhas de corte vacinadas com o mesmo produto empregado no grupo Present A. As dosagens de haptoglobina foram realizadas antes (-2 e 0 h) e às 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 e 168h após a administração da vacina. Os autores também verificaram concentrações maiores de HP nas novilhas vacinadas em comparação com as novilhas controle a partir das 16h até as 120h a partir da vacinação.

Em geral, o pico de leucócitos totais e neutrófilos no grupo de novilhas vacinadas foi observado às seis horas após a 1ª e 2ª dose da vacina, observando-se perfil semelhante nas novilhas não vacinadas após o *booster*. Oposto ao ocorrido com os neutrófilos, observou-se menor valor relativo (%) de linfócitos entre 6 e 24h. O pico de monócitos (abs/%) sanguíneos foi detectado às 24h com diminuição nos momentos posteriores após a 1ª dose nos grupos vacinados e não-vacinado (salina). O número absoluto e valores relativos (%) de eosinófilos foi maior nas primeiras 48 horas após a vacinação nas novilhas vacinadas e controle. O padrão geral dos tipos leucocitários caracterizado por leucocitose, neutrofilia, linfopenia, monocitose e eosinofilia indicam um possível efeito do cortisol, inclusive no grupo controle.

Hughes et al. (2017) avaliaram o efeito do estresse agudo e crônico por meio de aplicação de dexametasona (DEX) em bovinos vacinados (n=32) contra as viroses respiratórias, utilizando-se vacina comercial multivalente com hidróxido de alumínio como adjuvante. Os animais foram distribuídos em 3 tratamentos: 1) estresse agudo (AG) por meio da aplicação 0,5 mg/kg de DEX apenas em D0; 2) estresse crônico (CR) - 0,5 mg/kg DEX foi administrado por via intravenosa em D-3 a 0; 3) controle (CON). Todos os grupos (AG, CR e CON) foram vacinados em D0 com 5ml da vacina. Amostras

de sangue foram coletadas em -74h, -50h e -26 h; a intervalos de 0,5h entre o momento -4h a 6h, além das amostragens obtidas às 12h, 24h, 36h, 48h e 72h após à vacinação. Os autores observaram diferenças para leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos. Especificamente, os grupos CR e AG aumentaram leucócitos e neutrófilos, em contrapartida os linfócitos diminuíram em CR em comparação com CON. Os neutrófilos aumentaram rapidamente, dentro de 2h após DEX, nos novilhos AG. Os monócitos aumentaram transitoriamente em resposta ao tratamento com DEX em CR e AG. Em contraste, os eosinófilos foram maiores no grupo CON do que nos novilhos AG e CR. Em conclusão, foi observado a administração DEX imunossuprimiu a resposta inflamatória aguda principalmente nos animais CR. Administração de DEX é utilizada em pesquisas para indução de estresse. Os autores destacaram a necessidade de investigações futuras sobre o efeito do estresse em condições naturais que influenciam a resposta vacinal e saúde dos rebanhos.

O cortisol estimula as células-tronco para proliferação e diferenciação das células mielóides pelo aumento do fator estimulador de colônias de granulócitos, que também pode ser estimulado pela cascata inflamatória. Além disso, aumenta o influxo de neutrófilos do compartimento marginal para os vasos sanguíneos. Por fim, o cortisol diminui a expressão do receptor L-selectina na superfície dos neutrófilos, molécula fundamental para o rolamento dos neutrófilos pelos vasos sanguíneos durante o seu processo de migração da circulação aos tecidos. Ao contrário dos neutrófilos, os linfócitos circulantes aderem ao endotélio celular e posteriormente migram da circulação para outros tecidos, como nódulos linfáticos, baço, medula óssea e pele, onde são sequestrados (DAVIS et al., 2008; TORNQUIST; RIGAS, 2010). Todos estes mecanismos em conjunto provavelmente colaboraram para a leucocitose por neutrofilia observada tanto nas novilhas vacinadas como não vacinadas.

O leucograma de estresse observado às seis horas após a vacinação pode ser oriundo do manejo adotado durante a execução da etapa prática desta pesquisa, onde os animais eram transferidos do pasto para o curral ao final do dia, sendo vacinados às 24h para que fosse possível padronizar as colheitas das amostras de sangue às 6h da manhã, devido à necessidade do uso de equipamento em laboratório externo com funcionamento apenas em horário comercial. As amostras de soro das novilhas estão congeladas para a dosagem posterior do cortisol com o objetivo de endossar a hipótese relativa ao efeito do cortisol sobre o leucograma das vacas.

É difícil distinguir se o estresse observado nesta pesquisa era oriundo do simples manejo do gado ou vacinação, porém as maiores alterações no leucograma foram observadas no grupo de animais vacinados com a vacina oleosa após a 1ª dose e Present A após a 2ª dose.

A diminuição do número de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos a partir das 24 horas pós-vacinal também indica potencial migração dessas células aos tecidos facilitada ou não por um possível decréscimo no cortisol ao longo do tempo.

Em geral, o número de eosinófilos nas novilhas vacinadas foi menor que àquelas não vacinadas entre 6 e 168 horas após a 1ª dose da vacina, provavelmente devido à migração dessas células do sangue aos tecidos. A vacina Halum apresentou o menor número de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) às 72 horas em relação às demais vacinas. Os basófilos foram semelhantes entre os grupos após a 1ª dose, entretanto, a partir da 2ª dose observou-se menores valores no grupo Halum que os demais grupos vacinados e controle. Este menor número de eosinófilos e basófilos no grupo Halum provavelmente ocorreu porque esse adjuvante possui maior potencial para induzir resposta imune humoral Th2 que a resposta imune celular Th1 (AIMANIANDA et al., 2009). Este fenômeno ocorre porque as citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 e mastócitos, especialmente a IL-5, estimulam a liberação dos eosinófilos a partir da medula (TIZARD, 2008).

Os eosinófilos e basófilos possuem similaridade em relação às suas funções, pois ambos estão associados com as reações alérgicas denominadas associação às reações de hipersensibilidade imediata tipo I e reações de hipersensibilidade tardia do tipo III. As alergias pós-vacinais são provocadas pelas células do cultivo celular no qual o vírus foi produzido, soro residual, antígenos e outros produtos como conservantes (MARTINOD, 1995).

Nos processos alérgicos, a resposta imune Th2 exacerbada culmina com a produção da IgE e citocinas (IL-5), responsáveis pela quimiotaxia de eosinófilos e basófilos. A ligação da IgE aos receptores presentes na membrana destas células resultam na liberação de grânulos intracitoplasmáticos responsáveis pelas reações anafiláticas. Esta reação aparece minutos após a aplicação da vacina observando-se fraqueza, dispneia, vômitos, tremores, mucosas pálidas, salivação, edema pulmonar, abortamentos, colapso e morte. Já na hipersensibilidade tardia, a reação imune é mediada pelo complexo antígeno-anticorpo, que ativa a cascata do sistema complemento. Esta reação pode ser detectada entre 8 a 21 dias após a infecção.

Observa-se pápulas, eczemas, edema, prurido e adenomegalia (MARTINOD, 1995; TIZARD, 2008). Apesar dos frequentes relatos de alergias nas fazendas, nenhuma das novilhas vacinadas nessa pesquisa apresentou qualquer sinal de anafilaxia após as vacinações.

Em geral, a produção de ERO's pelas células sanguíneas estimuladas com PMA foi suprimida nas novilhas vacinadas em relação ao controle às 6 e 168h após a 1ª dose, especialmente nas novilhas vacinadas com Halum. Este mesmo fenômeno foi observado após 48 a 168 horas após 2ª dose da vacina. O grupo Halum apresentou menor valor de RRatio às 168h (3,01); o grupo oleoso às 48 horas (3,77); e o grupo Prezent A às 72 horas (1,73) após a 2ª dose das vacinas.

A produção de EROs ocorre via NADPH, ativada pelos neutrófilos na tentativa de eliminar os microrganismos. A destruição de patógenos ingeridos ocorre pela geração de ERO'S no fagossomo pela explosão respiratória (*burst oxidativo*), o qual gera potentes oxidantes (ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio) capazes de danificar a estrutura celular dos patógenos. A enzima responsável pelo metabolismo do oxigênio é NADPH-oxidase, complexo multiproteico composto por componentes citoplasmáticos (proteínas p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*), após estímulo se translocam em direção ao componente de membrana do complexo, conhecido como citocromo-b₅₅₅, o que culminando na ativação do complexo enzimático e subsequente produção de ERO's. As espécies reativas de oxigênio atuam juntamente com as enzimas lisossomais na destruição dos microrganismos fagocitados. Outro mecanismo utilizado por neutrófilos para eliminação de patógenos consiste na liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, *Neutrophill Extracellular Traps*), estruturas liberadas pelos neutrófilos ativados que possuem funções microbicidas e agem sobre os patógenos extracelulares (ELSBACH et al., 1992; TIZARD, 2008; FRANÇA, 2017).

Nesta pesquisa foi sugerido a influência do cortisol na produção de neutrófilos, sendo hipotetizada principalmente pelo manejo das novilhas na vacinação. Porém, diante destes achados em relação ao ERO's também pode-se sugerir que a reação inflamatória induzida pelos adjuvantes suprimiu a resposta dos fagócitos, visto que as novilhas controle apresentaram maior produção de EROs. Os adjuvantes causam dor e edema local, o que pode ter gerado a produção dos glicocorticóides. O cortisol é considerado imunossupressor e possui capacidade de inibir a produção de ERO's por macrófagos e neutrófilos (MARIDONNEAU-PARINI et al., 1989).

Hughes et al., (2017) relataram que o estresse induzido artificialmente com dexametasona em novilhos vacinados influenciou na expressão de L- selectina na superfície dos neutrófilos, na porcentagem de neutrófilos envolvidos na fagocitose, supressão do burst oxidativo.

Donovan et al. (2007) mensuraram a produção de EROS das células sanguíneas de equinos estimuladas ou não com o PMA em momentos antes (0h), seis, 24 e 72h após praticarem exercícios físicos. Foi possível verificar diminuição na produção de ERO's estimulado com PMA às seis, 24 e 72 horas após o exercício. O ERO's tem sua produção dependente de NADPH oxidase, sendo esse mecanismo considerado um complexo enzimático ligado à membrana plasmática intracelular, assim como em fagossomas usados por neutrófilos para engolfar microrganismos, sendo assim qualquer deficiência na NADPH oxidase pode resultar em baixa produção de EROS (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A produção extracelular de ERO's também pode ter ocorrido nesta pesquisa, pois a queda na concentração sérica de ferro pode ser associada à menor produção de ERO's nos grupos vacinados, pois o ferro pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), fato observado nas novilhas controle (ZHANG; ENNS, 2008).

O perfil leucocitário, assim como as dosagens de ferro e haptoglobina indicam que as novilhas vacinadas apresentaram perfil inflamatório sistêmico após as vacinações, estimulado especialmente pela vacina contendo saponina. Além disso, foi possível observar uma supressão da produção de espécies reativas de oxigênio no grupo de novilhas vacinadas.

7 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos pode-se concluir que as vacinas contendo os adjuvantes hidróxido de alumínio, compostos oleosos e Present A desencadearam resposta inflamatória sistêmica, porém a resposta foi muito mais intensa nas novilhas que receberam a vacina contendo saponina como adjuvante.

REFERÊNCIAS

- AIMANIANDA, V.; HAENSLER, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 6, p. 287–295, 2009.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte**, v. 41, n. 1, p. 133–139, 2017.
- ANTUNES, S. A.; CANZIANI, M. E. F. Hepcidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 3, p. 351–355, 2016.
- ANZILIERO, D.; MARTINS, M.; WEISS, M.; MONTEIRO, F. L.; ATAIDE, C. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58–63, 2015.
- AONO, F. H.; COOKE, R. F.; ALFIERI, A. A.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 242–248, 2013.
- ARENHART, S. **Construção e manipulação de clone infeccioso de uma amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina**. 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012).
- ARTHINGTO, N. J. D.; COOKE, R. F.; MADDOCK, T. D.; ARAUJO, D. B.; MORIEL, P.; DILORENZO, N.; LAMB, G. C. Effects of vaccination on the acute-phase protein response and measures of performance in growing beef calves. **Journal of animal science**, v. 91, n. 4, p. 1831–1837, 2013.
- BALDRICK, P. Dose site reactions and related findings after vaccine administration in safety studies. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 980–990, 2016.
- BASTOS, B. L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J. T.; GUEDES, M. T.; VALE, V. L.; MOURA-COSTA, L. F.; GUIMARÃES, J. E.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W.; MEYER, R. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 254, 2013.
- BEACOCK-SHARP, H.; DONACHIE, A. M.; ROBSON, N. C.; MOWAT, A. M. A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. **International Immunology**, v. 15, n. 6, p. 711–720, 2003.

BENICHO, G.; YAMADA, Y.; YUN, S. H.; LIN, C.; FRAY, M.; TOCCO, G. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. **Immunotherapy**, v. 3, n. 6, p. 757-770, 2011.

BIRGEL, E.H. **Hematologia clínica veterinária**. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. Patologia clínica veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária 1982. p. 2-34.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 51-68, 2004.

BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. The skin immune system its cellular constituents and their interactions. **Immunology Today**, v. 7, n. 7-8, p. 235-240, 1986.

BRASIL. Coordenação de fiscalização de produtos veterinários. Relatório de produtos com licença Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/arquivos-comunicacoes-e-instrucoes-tecnicas/ProdutosVigentesAbril2014.pdf>>. Acesso em: 06 nov 2017a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Calendário de vacinas obrigatórias 2017. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/copy3_of_CalendardeVacinao_mar_2017.pdf. Acesso em: 14 set 2017b.

CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 105-149, 2007.

CARROLL, J. A.; REUTER, R. R.; CHASE, C.C.; COLEMAN, S. W., RILEY, D. G.; SPIERS, D. E.; ARTHINGTON J. D.; GALYEAN, M. L. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, v. 15, n. 2, p. 81-89, 2009.

CATRON, D. M.; ITANO, A. A.; PAPE, K. A.; MUELLER, D. L.; JENKINS, M. K. Visualizing the first 50 hr of the primary immune response to a soluble antigen. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 341-347, 2004.

CHASE, C. C. Immunology Review/Refresher with Emphasis on Vaccinology. **AABP conference - American Association of Bovine Practitioners**, v. 40, 2007.

CHASE, C. C. L.; THAKUR, N.; DARWEESH, M. F.; MORARIE-KANE, S. E.; RAJPUT, M. K. Immune response to bovine viral diarrhea virus — looking at newly defined targets. **Animal health research reviews**, v. 16, n. 1, p. 4-14, 2015.

CHASE, C.; DANIELS, C.; GARCIA, R. Needle-free injection technology in swine: Progress toward vaccine efficacy and pork quality. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, n. 5, p. 254-261, 2008.

CHOWDHURY, S. I.; WEI, H.; WEISS, M.; PANNHORST, K.; PAULSEN, D. B. A triple gene mutant of BoHV-1 administered intranasally is significantly more efficacious than a BoHV-1 glycoprotein E-deleted virus against a virulent BoHV-1 challenge. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 4909-4915, 2014.

CORTESE, V. Immunology and Vaccination of Dairt Cattle. **Dairy Production Medicine**, p. 165-171, 2011.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, n. 5, p. 760-772, 2008.

DONOVAN, A.; LIMA, C. A.; PINKUS, J. L.; PINKUS, G. S.; ZON, L. I.; ROBINE, S.; ANDREWS, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell metabolism**, v. 1, n. 3, p. 191-200, 2005.

DONOVAN, D. C.; JACKSON, C. A.; COLAHAN, P. T.; NORTON, N. N.; CLAPPER, J. L.; MOORE, J. N.; HURLEY, D. J. Assessment of exercise-induced alterations in neutrophil function in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 11, p. 1198–1204, 2007.

ELLIS, J. A.; YONG, C. Systemic adverse reactions in young Simmental calves following administration of a combination vaccine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 1, p. 45–47, 1997.

ELSBACH, Peter; WEISS, J.; LEVY, O. Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**, v. 3, 1992.

FERREIRA, L. C. L.; COOKE, R. F.; MARQUES, R. S.; FERNANDES, H. J.; FERNANDES, C. E.; STELATO, R.; FRANCO, G. L.; LEMOS, R. A. A. Effects of vaccination against foot-and-mouth disease virus on reproductive performance of Bos indicus beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 401–405, 2016.

FERREIRA, R.M.; SIVIERI, M.; BORGES, D.P.; ANTONIO, T.S.; GONÇALVES, R.L.; BARUSELLI, O. S. Vaccination against IBR, BVD (Bioabortogen H[®]) and leptospirosis (Bioleptogen[®]) may increase the reproductive rates of beef cows. **Hora Veteriária**, v. 184, p. 19-22, 2011.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012.

FRANÇA, T. T. **Avaliação da formação de NETs em pacientes com deficiência de CD40L**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FULTON, R. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; D'OFFAY, J. M.; BOLIN, S. R.; MAES, R. K.; BAKER, J. C.; FREY, M. L. Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 3, p. 380–383, 1997.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GALANOS, C.; FREUDENBERG, M. A. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. **Immunobiology**, v. 187, n. 3–5, p. 346–356, 1993.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, p. 1434-43, 2012.

HEEGAARD, P. M. H.; DEDIEU, L.; JOHNSON, N.; LE POTIER, M. F.; MOCKEY, M.; MUTINELLI, F.; VAHLENKAMP, T.; VASCELLARI, M.; SØRENSEN, N. S. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: Current state and future developments. **Archives of Virology**, v. 156, n. 2, p. 183–202, 2011.

HUGHES, H. D.; CARROLL, J. A.; BURDICK SANCHEZ, N. C.; ROBERTS, S. L.; BROADWAY, P. R.; MAY, N. D.; BALLOU, M. A.; RICHESON, J. T. Effects of dexamethasone treatment and respiratory vaccination on rectal temperature, complete blood count, and functional capacities of neutrophils in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 4, p. 1502, 2017.

JONES, G. E.; MOULD, D. L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. **Research in veterinary science**, v. 37, n. 1, p. 87-92, 1984.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 115–129, 2004.

KREUTZ, Luiz Carlos. Resposta imunológica contra vírus. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 237-261, 2012.

KURODA, E.; COBAN, CEVAYIR; I.; KEN, J. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. **International reviews of immunology**, v. 32, n. 2, p. 209-220, 2013.

LEAL, P. V.; PUPIN, R. C.; SANTOS, A. C.; FACCIN, T. C.; SURDI, E.; LEAL, C. R. B.; BRUMATTI, R. C.; LEMOS, R. A. A. Estimativas de perdas econômicas causadas por reação granulomatosa local após uso de vacina oleosa contra febre aftosa em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 738–742, 2014.

LEE, S. R.; PHARR, G. T.; BOYD, B. L.; PINCHUK, L. M. Bovine viral diarrhea viroses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules genes expression in bovine peripheral blood monocytes. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 31, n. 5, p. 403-418, 2008.

LEMOS, A. D. R.; ISMAEL, L. A. S.; BOATO, C. C. M.; BORGES, M. T. F.; RONDÓ, P. H. D. C. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por

deficiência de ferro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 5, p. 596-599, 2010.

LINDBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 55–73, 2005.

LIPPOLIS, K.D.; COOKE, R.F.; SCHUBACH, K. M.; MARQUES, R. S.; BOHNERT, D. W. Effects of intravenous lipopolysaccharide administration on feed intake, ruminal forage degradability, and liquid parameters and physiological responses in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 7, p. 2859-2870, 2017.

LYCKE, N. From toxin to adjuvant: The rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 23–32, 2004.

MARIDONNEAU-PARINI, I.; ERRASFA, M.; RUSSO-MARIE, F. . Inhibition of O2-generation by dexamethasone is mimicked by lipocortin I in alveolar macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 6, p. 1936, 1989.

MARIN, M. S.; QUINTANA, S.; LEUNDA, M. R.; ODEÓN, A. C.; PÉREZ, S. E. Research in Veterinary Science Toll-like receptor expression in the nervous system of bovine alpha- herpesvirus-infected calves. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 422–429, 2014.

MARIN, M. S.; QUINTANA, S.; LEUNDA, M. R.; RECAVARREN, M.; PAGNUCO, E.; SPÄTH, E.; PÉREZ, S.; ODEÓN, A. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis. **Journal of virological methods**, v. 227, p. 14-22, 2016.

MARTINOD, S. Risk assessment related to veterinary biologicals: side-effects in target animals. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 14, p. 979-990, 1995.

MEEUSEN, E. N. T.; WALKER, J.; PETERS, A.; PASTORET, P. P.; JUNGENSEN, G. Current status of veterinary vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 489–510, 2007.

MOREFIELD, G. L.; SOKOLOVSKA, A.; JIANG, D.; HOGENESCH, H.; ROBINSON, J. P.; HEM, S. L. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. **Vaccine**, v. 23, n. 13, p. 1588–1595, 2005.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: ArtMed, 7ª edição. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Regulação hormonal e integração do metabolismo dos

mamíferos.. **Lehninger Princípios de Bioquímica**, 4th ed. São Paulo : Sarvier, Cap.23, p. 872-912, 2006.

NEWCOMER, B. W.; CHAMORRO, M. F.; WALZ, P. H. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 206, p. 78-83, 2017.

PALUDO, G. R.; PIMENTEL, C. M. M.; MELO, R. Q. D.; CARDOSO, A. G.; MELLO, F. P. D. S.; MOREIRA, M.; FUCK, B. H. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. *Revista . Bras. Zootec.*, v.31, n.3, p.1130-1142, 2002.

PAN, D.; VARGAS-MORALES, O.; ZERN, B.; ANSELMO, A. C.; GUPTA, V.; ZAKREWSKY, M.; MITRAGOTRI, S.; MUZYKANTOV, V. The effect of polymeric nanoparticles on biocompatibility of carrier red blood cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2016.

PECORA, A.; MALACARI, D. A.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M. S.; BELLIDO, D.; ESCRIBANO, J. M.; DUS SANTOS, M. J.; WIGDOROVITZ, A. Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 1, p. 4–8, 2015.

PEREIRA, M. H. C.; COOKE, R. F.; ALFIERI, A. A.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3–4, p. 156–162, 2013.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PLATT, R.; KESL, L.; GUIDARINI, C.; WANG, C.; ROTH, J. A. Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela® live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 187, p. 20-27, 2017.

PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A.; OFFIT, P. A. Influenza vaccines under development: Newer vaccines that contain live attenuated virus. *Vaccines*. p. 541, 2013.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RIBEIRO, C. P. **Avaliação da virusneutralização cruzada frente BVDV-1 e BVDV-2 no diagnóstico da diarreia viral bovina em animais naturalmente infectados**. 2009. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RIDPATH, J. F.; DOMINOWSKI, P.; MANNAN, R.; YANCEY, R.; JACKSON, J. A.; TAYLOR, L.; MEDIRATTA, S.; EVERSOLE, R.; MACKENZIE, C. D.; NEILL, J. D.

Evaluation of three experimental bovine viral diarrhea virus killed vaccines adjuvanted with combinations of Quil A cholesterol and dimethyldioctadecylammonium (DDA) bromide. **Veterinary research communications**, 34(8), 691-702, 2010.

ROARK, C. L.; SIMONIAN, P.L.; FONTENOT, A.P.; BORN, W. K.; O'BRIEN, R.L. $\gamma\delta$ T cells: an important source of IL-17. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 3, p. 353-357, 2008.

ROBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. **FAUSTO, N.; KUMAR, V.; ABBAS, AK Robins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**, v. 7, p. 91, 2005.

RODRIGUES, M. C.; COOKE, R. F.; MARQUES, R. S.; CAPPELLOZZA, B. I.; ARISPE, S. A.; KEISLER, D. H.; BOHNERT, D. W. Effects of vaccination against respiratory pathogens on feed intake, metabolic, and inflammatory responses in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 9, p. 4443–4452, 2015.

ROMERA, S.; PUNTEL, M.; QUATTROCCHI, V.; ZAJAC, P. Del; ZAMORANO, P.; BLANCO VIERA, J.; CARRILLO, C.; CHOWDHURY, S.; BORCA, M. V.; SADIR, A. M. Protection induced by a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 8, 2014.

ROTH, James A. Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. **Advances in veterinary medicine**, v. 41, p. 681-700, 1999.

RUIZ, V.; MOZGOVOJ, M. V.; DUS SANTOS, M. J.; WIGDOROVITZ, A. Plant-produced viral bovine vaccines: what happened during the last 10 years?. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 8, p. 1071-1077, 2015.

RYMAN, V. E.; PACKIRISWAMY, N.; SORDILLO, L. M. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 2, p. 135–149, 2015.

SADAT, S. M. A.; SNIDER, M.; GARG, R.; BROWNLIE, R.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Local innate responses and protective immunity after intradermal immunization with bovine viral diarrhea virus E2 protein formulated with a combination adjuvant in cattle. **Vaccine**, v. 35, n. 27, p. 3466–3473, 2017.

SALIBA, H.; HEURTAULT, B.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; FLACHER, V.; FRISCH, B.; FOURNEL, S.; CHAMAT, S. Enhancing tumor specific immune responses by transcutaneous vaccination. **Expert Review of Vaccines**, n. just-accepted, 2017.

SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 289-299, 2005.

SHARP, F. A.; RUANE, D.; CLAASS, B.; CREAGH, E.; HARRIS, J.; MALYALA, P.; O'NEILL, L. A. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 870-875, 2009.

SHEN, S. S.; YANG, Y. W. Antigen delivery for cross priming via the emulsion vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 30, n. 9, p. 1560–1571, 2012.

SILVA, L. F. **Imunogenicidade de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos e cobaíes**. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva)- Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

SILVA, M. R. A Brief Survey of the History of Inflammation. **Agents and Actions**, v. 8, p. 1-2, 1978.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, M. C. S. DA SILVA, Roberta Dias et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 99-107, 2012.

SIVAKUMAR, S. M.; SAFHI, M. M.; KANNADASAN, M.; SUKUMARAN, N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 197–206, 2011.

SNIDER, M.; GARG, R.; BROWNLIE, R.; VAN DEN HURK, J. V.; HURK, S. van D. L. van den. The bovine viral diarrhea virus E2 protein formulated with a novel adjuvant induces strong, balanced immune responses and provides protection from viral challenge in cattle. **Vaccine**, v. 32, n. 50, p. 6758–6764, 2014.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity 1. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4967–4982, 2016.

SOUTO, L.; PIZZO, G. **Vacinação estratégica contra Diarreia Viral Bovina (BVD), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Leptospirose melhora a taxa de prenhes em protocolos de IATF em vacas de corte da raça Nelore**. In: Informativo Técnico Criar LG, 2014. Disponível em <<http://www.criarg.com.br/site/noticias.aspx>>. Acesso em: 15 ago 2017.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 273-281, 2003.

STOKKA; G. L.; EDWARDS; A. J.; SPIRE; M. F.; BRANDT JR; R. T.; SMITH; J. E. Inflammatory response to clostridial vaccines in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 3, p. 415-419, 1994.

SUMMERFIELD, A.; AURAY, G.; RICKLIN, M. Comparative Dendritic Cell Biology of Veterinary Mammals. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 3, n. 1, p. 533–557, 2015.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2008.

TORNQUIST, S. J.; RIGAS, J. Interpretation of ruminant leukocyte. In: SCHALM, O. W. **Veterinary hematology**. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p. 307-312, 2010.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v.31, n.113, p.3-4, 2006.

VARTAK, A.; SUCHECK, J. Recent advances in subunit vaccine carriers. **Vaccines**, v. 4, n. 2, p. 12, 2016.

VON ANDRIAN, U.; MACKAY, C. T-Cell Function and Migration. Two Sides of the Same Coin. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 14, p. 1020–1034, 2000.

WALZ, P. H.; GIVENS, M. D.; RODNING, S. P.; RIDDELL, K. P.; BRODERSEN, B. W.; SCRUGGS, D.; SHORT, T.; GROTELUESCHEN, D. Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live vi. **Vaccine**, v. 35, n. 7, p. 1046–1054, 2017.

WALZ, P. H.; MONTGOMERY, T.; PASSLER, T.; RIDDELL, K. P.; BRADEN, T. D.; ZHANG, Y.; GALIK, P. K.; ZUIDHOF, S. Comparison of reproductive performance of primiparous dairy cattle following revaccination with either modified-live or killed multivalent viral vaccines in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8753–8763, 2015.

WEISS, M.; BRUM, M. C. S.; ANZILIERO, D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus 1 as a candidate vaccine strain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 843-851, 2015.

WERLING, D.; PIERCY, J.; COFFEY, T. J. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 1–2, p. 2–11, 2006.

WHEATER P, BURKITT G, STEVEN A, LOWE J. Acute and Chronic inflammation and sequelae, Chapter 2. In **Basic Histopathology**. A Colour Atlas and Text. Churchill Livingstone: New York, NY; p. 7–19, 1985.

XIANG, S. D.; SCHOLZEN, A.; MINIGO, G.; DAVID, C.; APOSTOLOPOULOS, V.; MOTTRAM, P. L.; PLEBANSKI, M. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2006.

ZHANG A. S; ENNS C.A. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. **Journal Biological Chem**, v. 284, p. 711-715, 2008.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.

**CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DOS ADJUVANTES SOBRE OS EFEITOS ADVERSOS
E IMUNIDADE HUMORAL EM NOVILHAS VACINADAS CONTRA
BVDV E BoHV-1**

8 INTRODUÇÃO

A prevenção relacionada às perdas reprodutivas associadas aos vírus da BVDV e BoHV-1 têm sido adotadas em fazendas de leite e corte, a vacinação é uma das ferramentas para este tipo de controle, visando principalmente maiores concentração de anticorpos neutralizantes e aumento nas taxas de prenhez (AONO et al., 2013; WALZ et al., 2017).

As vacinas registradas no Brasil, ao redor de 14, são todas multivalentes e em sua maioria inativadas (BRASIL, 2017a). As vacinas inativadas contém partículas virais mortas incapazes de causar replicação nas células imunes do hospedeiro, sendo necessária a adição de maior massa antigênica, maior concentração de adjuvantes e maior número de doses para induzir imunidade satisfatória (VARTAK; SUCHECK, 2016).

O hidróxido de alumínio, emulsões oleosas e *ISCOMs* são os principais adjuvantes usados na Medicina Veterinária. Os mecanismos podem variar de acordo com as composições dos adjuvantes, porém a conceito central é de que aumentem o reconhecimento e captação de antígenos pelas APC's (SIVAKUMAR et al., 2011), porque esse é o 1º sinal da resposta imune inata responsável pela modulação e desencadeamento da resposta imune adaptativa Th1 e Th2. Com base neste princípio, a resposta imune inata tem sido chamada de “A ciência dos adjuvantes” (CHASE, 2007).

Após o reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs da superfície celular são secretadas citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela maioria da reações locais ou sistêmicas observadas após as vacinações. Sendo assim, a reação no local da injeção indica atividade celular, produção de citocinas e movimentação dos linfócitos dentro dos vasos linfáticos e sanguíneos do animal. As reações adversas são essenciais para que a resposta imune seja gerada, porém não de forma exacerbada (ROTH, 1999).

A necessidade de potencialização das vacinas inativadas com o uso de maior quantidade e/ou determinados tipos de adjuvantes coloca o animal em risco às reações locais, que além de prejuízos, impõe ao animal muito desconforto após múltiplas aplicações (SHAMS, 2005; NEWCOMERER et al., 2017).

Os efeitos locais ocasionados após a administração de qualquer tipo de imunógeno é seguida de uma resposta inflamatória local caracterizada pela presença

dos sinais cardinais da inflamação, tais como edema, rubor, dor, calor e/ou perda de função. Estas manifestações locais são causadas pelo aumento do fluxo sanguíneo devido a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, o que resulta no extravasamento e acúmulo de plasma nos tecidos característicos do edema inflamatório (RYMAN et al., 2015). A reação local inflamatória deve ser diferenciada dos efeitos indesejáveis (BALDRICK, 2016) caracterizados por extensos piogranulomas com intenso infiltrado de neutrófilos íntegros e necróticos, macrófagos com citoplasma vacuolizado, além de linfócitos e plasmócitos (LEAL et al., 2014).

As reações sistêmicas geralmente estão associadas à hipertermia, perda de peso, redução na produção de leite e/ou até distúrbios neurológicos. A reação anafilática ou anafilactóide podem ocorrer minutos ou horas após a vacinação, enquanto as reações de hipersensibilidade tardia do tipo-III ocorre entre oito a 25 dias após injeção. O risco de reações sistêmicas aumentam após a 3ª ou 4ª vez que são aplicadas (MARTINOD, 1995).

O efeitos adversos também podem ser influenciados pela interação entre o adjuvante e antígenos específicos, e também pelo tipo de vacina aplicada. Em geral, as vacinas vivas são frequentemente associadas com hipertermia, hiporexia, apatia e queda na produção de leite. As vacinas inativadas geralmente produzem reações mais localizadas em torno do local da injeção, especialmente induzidas pelos adjuvantes com efeito depósito (HEEGAARD et al., 2012). Os antígenos bacterianos, contendo lipopolissacarídeos, geralmente causam os efeitos adversos mais comumente observados nas fazendas como hiporexia, queda na produção, abortamentos, morte embrionária precoce e choque endotoxêmico (CORTESE, 2011).

Diante deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos adversos associados às reações locais e sistêmicas, assim como verificar a resposta imune humoral, induzida por vacinas reprodutivas contendo diferentes tipos de adjuvantes.

9 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 6229201216.

9.1 FÊMEAS BOVINAS

As fêmeas desta pesquisa eram oriundas da fazenda experimental da Agência Paulista e Tecnologia do Agronegócio – APTA Gado de Leite, localizada na cidade de Nova Odessa – São Paulo (22°75'S de latitude e 47°27'W de longitude). Esta propriedade foi selecionada por não realizar vacinação para BVDV e BoHV-1 e possuir histórico de baixa soro-prevalência (13%) para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). O protocolo sanitário adotado pela fazenda é composto apenas pelas vacinas obrigatórias exigidas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Febre Aftosa e Brucelose (BRASIL, 2017b).

A etapa experimental à campo foi conduzida entre Novembro de 2015 a Março de 2016 entre o verão e outono. Neste período, as novilhas entre 15 a 24 meses de idade, eram mantidas sob manejo extensivo com fornecimento de água e sal mineral “*ad libitum*”. Trinta e cinco novilhas foram selecionadas, das quais 68,57% (24/35) não haviam sido inseridas nos protocolos de Inseminação Artificial (IA); 17,14% (6/35) estavam prenhas com idade gestacional ao redor de 90 dias; e 14,28 (5/35) haviam sido inseminadas um mês (5/10/2015) antes do início das atividades desta pesquisa. As identificações, idades e o manejo reprodutivo adotado pela fazenda durante o período experimental estão descritos no apêndice 1.

9.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As 35 novilhas selecionadas previamente foram investigadas para a exclusão de infecções para o BVDV e BoHV-1. Amostras de soro sanguíneo e sangue total foram obtidas para a soroneutralização (SN) para BVDV e BoHV-1, além da reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase para BVDV (RT-PCR). A RT-PCR do sangue total para o BVDV foi repetida após 21 dias para a distinção entre possível infecção transitória ou persistente.

9.2.1 Preparo de amostras

a) Obtenção do soro sanguíneo

O soro sanguíneo dos novilhas foi obtido a partir de sangue colhido em tubos sem anticoagulante, centrifugados a 800 x g por 15 minutos. Após a retração do coágulo, o soro foi cuidadosamente removido e acondicionado em microtubos.

b) Separação de *buffy coat*

Amostras de sangue foram coletadas em tubos com ACD (Ácido Cítrico Citrato de Sódio e Dextrose) do tipo vacutainer®, em seguida, as amostras foram homogeneizadas por inversão 10 vezes. Os tubos foram centrifugados a 800 x g por 15 minutos a 18° C. Após a centrifugação, o plasma foi descartado e a camada de leucócitos (*buffy coat*) removida. Em seguida, os leucócitos foram lisados pela adição da solução de lise Tris-cloreto amônia (0.01 M Tris em 0.85% NH₄Cl) (Anexo A), o quão suficiente para se obter 14mL de solução final. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em estufa de CO₂, a 37°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados

em 450 x g por 10 minutos, em seguida, as células foram lavadas em 5mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Anexo B) por duas vezes a 450 x g por 5 minutos. Após a última lavagem, o *buffy coat* foi ressuspenso em 1mL de PBS em tubos tipo eppendorf e centrifugados em 900 x g por 1 minuto. Por fim, retirou-se o PBS e o *buffy coat* foi acondicionado em microtubos nucleasse *free* e conservados a -80°C para a realização do RT-PCR.

As amostras foram processadas no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico.

9.2.2 Soroneutralização

A técnica de SN foi realizada estritamente de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2017) no Laboratório de Viroses de Bovinos - Instituto Biológico. Para tanto, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando uma diluição constante do soro em $\log_2$ a partir das diluições 1:10 (BVDV-NADL) e 1:2 (BoHV-1-Los Angeles) tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM (*Minimum Essential Medium*) contendo 1% de antibióticos e 5% de soro fetal bovino livre de anticorpos para BVDV.

Para o BVDV, o soro foi previamente diluído 1:5 antes de adicioná-los aos poços, o BoHV-1 com diluição inicial 1:2 foram adicionados 50 μ L de soro em duplicatas nas cavidades das placas, no qual adicionou-se 50 μ L da solução do respectivo vírus contendo TCID₅₀/100 μ L (50% *tissue culture infective doses*). Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora para BVDV e por 18-24h para BoHV-1, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, suspensão de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) foram adicionadas em cada cavidade das placas. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 4-5 dias.

A infectividade foi indicada pelo “Efeito Citopático” (ECP) visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade e consequentemente o ECP em ambas as cavidades de cada diluição. A potência do vírus foi observada na retrotitulação através do cálculo do título, de acordo com Reed e Muench (1938).

9.2.3 RT-PCR para o BVDV

A extração do ácido nucléico foi feita empregando-se solução comercial (Trizol LS® Reagent)¹⁴. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) convencional foi realizada de acordo com as instruções do manual do fabricante do kit comercial¹⁵.

Os primers utilizados na reação detectaram regiões comuns para BVDV 1, 2 e Hobi-like baseados em uma sequência de 290 nucleotídeos, localizados na região 5' não traduzida (5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3' e 5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3') de acordo com Weinstock et al., 2001. O material genético amplificado foi introduzido em poços em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X à voltagem de 100V por uma hora. Os amplicons foram evidenciados após coloração com gel red diluído (1:150) em nuclease free water¹⁶, e a visualização foi feita utilizando o transluminador sob luz ultravioleta (320nm). Os fragmentos de DNA foram comparados com o padrão de pares de base apresentando incrementos de 100 pb (DNA ladder de 100 pb)¹⁷. As amostras foram consideradas positivas quando a amostra testada apresentou uma banda no tamanho do controle positivo e negativo na ausência de banda.

9.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As novilhas selecionadas foram distribuídas de forma randomizada em quatro grupos experimentais denominados de acordo com a formulação das vacinas comerciais administradas: Halum (n=9), Oleosa (n=10), Prezent A (n=10) e Salina (n=6), conforme ilustrado no quadro 3.

As novilhas receberam duas doses das diferentes vacinas comerciais (5mL), com intervalo de 21 dias, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os animais do

¹⁴ Invitrogen®, São Paulo-SP, Brasil.

¹⁵ Access Quick™ RT-PCR System, Promega, São Paulo-SP, Brasil.

¹⁶ Promega®, São Paulo-SP, Brasil.

¹⁷ Invitrogen®, São Paulo-SP, Brasil.

grupo não-vacinado receberam injeção de solução salina (5mL) nos momentos previstos para as vacinações. A via de aplicação realizada foi a subcutânea na região da tábua do pescoço do lado direito.

Quadro 3 - Constituição dos grupos experimentais de acordo com a composição de cada vacina – São Paulo – 2017

Grupos	Adjuvantes	Composições
Halum (n=9)	Hidróxido de alumínio (Alhydrogel®)	BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 – inativado, cepas cedidas pelo INTA e CEVAN
		BoHV-1 (Los Angeles) - inativado
Oleosa (n=10)	Emulsão com óleo mineral	**BVDV-1 e BVDV 2 (inativado)
		BoHV-1 e BoHV-5* (inativado)
Prezent A (n=10)	Combinação de Saponina Quil A®, colesterol e Amphigen®	BVDV-1 (5960) e BVDV-2 (53637) - inativado
		BoHV-1 (Cooper) – quimicamente alterada termossensível
Salina (n=6)	-	Aplicação de solução salina

Fonte: (BACCILLI, C. C., 2017).

Legenda: CEVAN = Centro de Virologia Animal, Argentina; INTA=Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina; **Cepas não fornecidas pelo fabricante.

9.4 MANEJO DAS NOVILHAS DURANTE O EXPERIMENTO

No dia da vacinação (D0) e *booster* (D21), as novilhas eram manejadas em dois momentos:

- 3.) 22:00 até 00:00 - avaliações prévias às injeções e aplicação das vacinas;
- 4.) 4:00 às 6:00 – 1ª avaliação após a aplicação das vacinas

Nos momentos posteriores às vacinações e *booster*, as novilhas eram transferidas do pasto para o curral de espera às 17 horas do dia anterior às coletas. Na manhã seguinte, as novilhas eram transferidas para troncos de contenção para a realização das avaliações.

9.5 MOMENTOS DAS AVALIAÇÕES

Os efeitos adversos das novilhas foram avaliados antes (0 horas) e após a aplicação das vacinas às 6, 24, 48, 72 e 168 horas (Figura 2a). A resposta imune adaptativa para o BVDV e BoHV-1 foram determinados no momento da vacinação (D0), no dia do *booster* (D21) e 21 dias (D42) após a segunda dose da vacina, conforme ilustrado na figura 15.

Figura 15 - Diagrama representativo das avaliações – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: 6h - seis horas após aplicação da vacina; 24h: 1 dia; 48h: 2 dias; 72h: 3 dias; 168h: 7 dias; D0: no momento da vacinação; D21: no momento da 2ª dose; D42: 21 dias após a 2ª dose.

9.6 AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro sanguíneo para determinação de títulos de anticorpos específicos contra o BVDV e BoHV-1.

9.7 EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos adversos foram considerados como manifestações apresentadas pelas novilhas por meio de reações locais e sistêmicas induzidas após a aplicação das vacinas, de acordo com os procedimentos apresentados por Ridpath et al., (2010).

9.7.1 REAÇÕES LOCAIS

9.7.1.1 Escore sinais cardinais

Os animais foram avaliados por inspeção e palpação periódica no local da injeção para a detecção de reações inflamatórias utilizando-se escores dos principais sinais cardinais: ausência (0) ou presença(1) de dor, calor e rubor no local de aplicação.

9.7.1.2 Mensuração da espessura da pele

As medidas da espessura da pele foram coletadas no sítio da injeção com o auxílio de um paquímetro. Os dados avaliados foram medidos (altura x largura) e expressos em milímetros (mm²), conforme ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Mensuração da pele em relação à altura (a); largura (b) – São Paulo – 2017

a)

Fonte: (BACCILI, C. C., 2016).

b)

9.7.1.3 Temperatura no sítio da injeção

As imagens termográficas foram capturadas em local coberto do curral de manejo. O horário definido para as capturas de imagens foi preconizado das 22:00 às 00:00 em 0h e das 4:00h às 6:00h para os momentos seguintes. As séries de imagens foram fotografadas antes (0h) até 168h após a vacinação e *booster*.

A temperatura média do ponto de aplicação das vacinas foram avaliadas por meio de imagens termográficas. Os termogramas dos aspectos laterais do pescoço das novilhas foram pré-determinadas em uma área de aproximadamente 10x10 cm, capturados a uma distância de 1,00m em linha reta ao lado direito do animal. Uma câmera infravermelha FLIR T440 (FLIR Systems, Inc., Portland, USA) com frequência de imagem 60 Hz, faixa espectral 7,5-13 μm , 640 $\times$ 480 pixels, sensibilidade térmica $<0,045^\circ\text{C}$ a 30°C , capacidade de registro de temperatura média de -20°C até 1.200°C , onde cada grau foi representado por uma escala de diferentes cores indicadas na parte inferior do aparelho e apresentada na imagem capturada (figuras 17). A referida câmera corrige automaticamente diferenças térmicas ambientais e emissividade refletida, para minimizar as influências do meio externo.

As imagens termográficas foram analisadas por meio de software específico da câmera FLIR Systems, sendo utilizada uma emissividade de 0,95%, temperatura refletida de 20°C , umidade relativa de 50% e temperatura atmosférica 20°C . Para cada

fotografia foi classificada o ponto da aplicação abrangendo uma área de 70mm², sendo avaliada a temperatura média (figura 17).

Figura 17 - Imagem termográfica com a região pré-determinada no software FLIR antes 0h da vacinação (a); após 24h da aplicação da vacina (b) – São Paulo – 2017

(a)

Fonte: (BACCILI, C. C., 2016).

9.7.2 REAÇÕES SISTÊMICAS

As reações sistêmicas induzidas pelas vacinações foram observadas por meio de escore respiratório, escore fezes e escore de efeitos adversos. Os critérios adotados para a interpretação dos achados oriundos dos escores estão especificados nos quadros 4 e 5.

9.7.2.1 Escore de manifestações clínicas associadas à DRB

As manifestações clínicas relacionadas ao Complexo Respiratório Bovino foram avaliadas por meio de escore de saúde previamente publicados pela Universidade de Wisconsin (Madison) por McGuirk (2008), sendo atribuído o escore de 0 a 3 de acordo com a severidade das manifestações clínicas em relação a temperatura retal, tosse, secreção nasal e ocular. Por fim, somou-se as pontuações para a obtenção de um escore final, onde a soma ≥ 5 foi usada como ponto de corte para distinguir os animais com ou sem doença respiratória (Quadro 4).

Quadro 4 - Escores de manifestações clínicas realizados em novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Escores	Temperatura retal (°C)	Tosse	Secreção nasal	Secreção ocular
0	37,7 - 38,2	Ausente	Serosa	Serosa
1	38,3 - 38,8	Presente e única, quando estimulada	Pouca quantidade, unilateral	Pouca quantidade
2	38,9 - 39,3	Presente e repetida quando estimulada, ou ocasional quando espontânea	Excessiva, mucosa e bilateral	Moderada quantidade bilateral
3	$\geq 39,4$	Presente, repetida e espontânea	Abundante, mucopurulenta, bilateral	Intensa quantidade, bilateral

Adaptado de: McGuirk (2008) por Baccili, C. C. (2017)

9.7.2.2 Escore de fezes

A consistência das fezes foi adaptado de por McGuirk (2008), sendo categorizada em escores, sendo 0 – consistência normal e 1 – líquida, conteúdo fecal aderido no períneo e cauda.

9.7.2.3 Efeitos colaterais indesejáveis

Os efeitos colaterais indesejáveis induzidos pela vacinação foram estabelecidos considerando-se: 0-ausência de sinais, 1- Reação anafilactóide/anafilática, 2- Depressão/diminuição da coordenação (quadro 5).

Quadro 5 - Escores de efeitos adversos adotado para detecção de reação sistêmica em novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Escore	Efeitos colaterais indesejáveis
0	Ausente
1	Reação anafilactóide/anafilática
2	Depressão/diminuição da coordenação

Adaptado de: Ridpath et al (2010) por Baccili, C. C. (2017)

9.8 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

9.8.1 Produção de anticorpos neutralizantes para BVDV e BoHV-1

A titulação de anticorpos específicos para o BVDV e BoHV-1 foi realizada por meio da técnica de soroneutralização (SN) conforme procedimentos já descritos no tópico

9.9 ANALISE ESTATISTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Todas as variáveis foram avaliadas quanto à distribuição em relação à curva gaussiana pela função *Guided Data Analyses*. Alguns dados não apresentaram distribuição normal e foram submetidos a uma transformação logarítmica por $\log_{10}$, raiz quadrada ou inversa para obter uma distribuição normal das variáveis .

As variáveis foram testadas quanto aos efeitos fixos dos tratamentos (Halum, Oleosa, Prezent A e Solução Salina) e dias (0, 6, 24, 48, 72 e 168h), assim como a interação dos efeitos tratamento versus dia por meio de procedimento MIXED (PROC-mixed, SAS), com teste post hoc Least Significant Difference (LSD). Os modelos foram testados conforme as estruturas de covariância, utilizando critério *Akaike Information Criterion* (AIC).

No caso onde ocorreram as transformações, o P apresentado diz respeito aos testes relacionados com os valores transformados, enquanto os valores descritos são reais. As médias e desvios padrões utilizados foram referentes ao dados originais.

Os dados qualitativos (escores e SN) foram apresentados em valores frequências, sendo a comparação entre os grupos realizada pelo teste de Qui-quadrado e entre os tempos pelo teste de Cochran's Q. As análises múltiplas entre os tempos foram analisadas pelo teste post hoc McNemar com correção de Bonferroni, sendo consideradas significativas quando $P \geq 0,003$ (*).

Por fim, foi calculada a correlação de Pearson para os dados paramétricos entre a temperatura média encontrada nas imagens termográficas e a temperatura retal expressas pelas novilhas.

As análises foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (*).

10 RESULTADOS

Este trabalho avaliou os efeitos adversos e resposta imune humoral induzida por três vacinas comerciais reprodutivas contendo diferentes tipos de adjuvantes.

10.1 EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos adversos foram considerados como as manifestações apresentadas pelas novilhas por meio de reações locais e sistêmicas após a aplicação da vacina.

10.1.1 REAÇÕES LOCAIS

As reações locais foram avaliadas pelos sinais cardinais da inflamação por meio de escore clínicos associado à mensuração da espessura cutânea e temperatura no local da injeção por meio de imagens termográficas.

Os valores absolutos e frequências (n/%) de animais manifestando dor e calor em cada um dos grupos experimentais após a vacinação (1ª dose) e *booster* (2ª dose) estão dispostos na tabela 8.

Foi possível observar diferenças entre os grupos às 6h ($P=0,012$), 24h ($P=0,044$), 72h ($P=0,001$) e 168h ($P=0,041$) após a 1ª dose, verificando-se uma maior frequência (%) de novilhas com o local da aplicação dolorido no grupo de animais que receberam as vacinas em relação ao controle não vacinado(salina), especialmente às 6 horas após a vacinação e *booster*. As novilhas que receberam a vacina oleosa apresentaram dor mais persistente após a 1ª dose, entretanto este perfil foi mais visível para o grupo Prezent A após a 2ª dose da vacina.

As reações locais após o *booster* também foram detectadas após 6h ($P=0,001$), 24h ($P=0,015$), 48h ($P=0,002$) e 168h ($P=0,042$). Nestes momentos, as novilhas que receberam a vacina contendo Prezent A apresentavam maior intensidade de dor, quando comparadas àquelas que receberam o adjuvante Oleoso, Halum e Salina.

A análise no tempo pelo teste de Cochran's em cada grupo experimental demonstrou diferenças apenas nos grupos de novilhas vacinadas. Após a 1ª e a 2ª dose, as novilhas do grupo Halum e Prezent A apresentavam-se mais reativas à palpação dolorosa às 6h com diminuição gradativa até 168h. Em contrapartida, as novilhas que receberam a vacina oleosa mantiveram-se reativas entre 6h e 168h ($P \leq 0,05$). A análise múltipla entre os tempos pelo teste post hoc (Mc Nemar) com correção de Bonferroni não revelou diferenças entre os momentos para nenhum dos grupos experimentais ($P \geq 0,016$).

A variável calor apresentou diferenças entre grupos às 6h ($P=0,019$), 24h ($P=0,001$), 48h ($P=0,003$) e 72h ($P=0,012$) após 1ª dose, observando-se um maior número de novilhas manifestando sinal positivo ao calor nos grupos Prezent A e Oleosa em relação ao grupo Halum e Salina. Não foi possível detectar diferenças entre os grupos para a variável calor após o *booster*.

A análise no tempo pelo teste de Cochran's demonstrou variações nos grupos Halum, Oleosa e Prezent A após a 1ª e 2ª doses das vacinas, observando-se maior intensidade nas reações de calor após a 1ª dose no momento 24h para Prezent A, 48h para Halum e mais adiante às 72h no grupo Oleosa. Em relação à 2ª dose, observou-se maior precocidade do aumento da temperatura local na maioria das novilhas vacinada com Prezent A (6h), Halum (24h) e Oleosa (48h). As comparações múltiplas entre os tempos pelo teste post hoc Mc Nemar não revelou diferenças para nenhum dos grupos experimentais ($P \geq 0,008$).

Não foi possível verificar diferenças entre as novilhas desta pesquisa para o sinal de rubor devido à ausência de animais positivos para esta variável, todos animais foram negativos para este escore. Fato semelhante pode ser observado para novilhas que receberam placebo, no qual foram indetectáveis sinais de dor, calor e rubor.

Tabela 8 - Frequências (n/%) dos escores de sinais cardinais (dor e calor) expresso por novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variável		1ª dose					2ª dose				
		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	X²	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	X²
Dor	0h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	6h	7/78	7/70	7/70	0/0	0,012	8/89	6/60	9/90	0/0	0,001
	24h	5/56	7/70	6/60	0/0	0,044	6/67	5/50	8/80	0/0	0,015
	48h	5/56	5/50	3/30	0/0	0,123	7/78	7/70	9/90	0/0	0,002
	72h	5/56	8/80	3/30	0/0	0,013	3/33	4/40	5/50	0/0	0,224
	168h	4/44	7/70	3/30	0/0	0,041	01/11	5/50	01/10	0/0	0,042
	Cochran's	0,004	0,000	0,002	-		0,001	0,001	0,000	-	
Calor	0h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	6h	4/44	4/40	8/80	0/0	0,019	4/44	5/50	7/70	0/0	0,057
	24h	2/22	7/70	9/90	0/0	0,001	6/67	5/50	5/50	0/0	0,079
	48h	6/67	7/70	5/50	0/0	0,035	2/22	4/40	6/60	0/0	0,079
	72h	3/33	8/80	6/60	0/0	0,012	2/22	4/40	3/30	0/0	0,348
	168h	0/0	2/20	2/20	0/0	0,336	01/11	3/30	0/0	0/0	0,148
	Cochran's	0,006	0,001	0,000	-		0,004	0,025	0,000	-	

Legenda: (h): horas; Halum (n=9); Oleosa (n=10); Prezent A (n=10); Salina (n=6); X² = teste de Qui-quadrado. Foram consideradas significativas quando P≤0,05.

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Os valores médios da mensuração cutânea (mm²), assim como as diferenças obtidas entre os grupos e tempos das novilhas Halum, Oleosa, Prezent A e Salina após a 1ª e 2ª dose estão expressos na tabela 9 e figura 18.

O efeitos entre tratamentos, dia e Trt x Dia foram analisados pelo General Linear Model Procedure PROC GLM. Foram observadas diferenças entre os grupos (P=0,000) e tempos (P=0,000), sendo possível também detectar a interação Trt x dia (P=0,000) após a 1ª e 2ª doses dos imunógenos.

A mensuração da espessura cutânea possibilitou a identificação de aumento de volume no local da aplicação em todas as novilhas vacinadas, após a aplicação da 1ª dose entre 6h até 168h. Aumento máximo da espessura cutânea foi observada às 6h (29mm²), 24h (60mm²) e 72h (43mm²) após a aplicação da 1ª dose das vacinas Halum, Oleosa e Prezent A, respectivamente. Em relação à 2ª dose da vacina, observando-se maior espessamento cutâneo em relação à 1ª dose para as vacinas Halum (41mm²) e Prezent A (50mm²), entretanto o aumento de volume local após o *booster* com a vacina oleosa permaneceu semelhante ao observado após a 1ª dose (61mm²).

As mensurações cutâneas das novilhas do grupo que receberam solução Salina foram diferentes durante a 1ª e 2ª dose comparadas aos grupos Halum, Oleosa e Prezent A, mostrando-se sempre com espessuras inferiores às novilhas vacinadas.

As temperaturas (°C) médias em relação ao ponto da injeção de novilhas Halum, Oleosa, Prezent A, assim como as diferenças entre os grupos e tempos estão apresentados na tabela 9 e figura 18.

As variáveis sofreram efeito entre os grupos ($P=0,000$), quanto aos dias analisados ($P=0,000$), assim como interação entre Trt x dia ($P=0,000$).

As temperaturas médias observadas no sítio das injeções foram diferentes em relação aos tratamentos no intervalo entre 0h até 72h após a aplicação da 1ª dose. A temperatura média observada no grupo Salina foram menores que àquelas observadas na pele das novilhas vacinadas. O pico de temperatura local foi precoce no grupo Prezent A às 6h após a 1ª dose, entretanto as temperaturas locais foram maiores no grupo Oleoso entre 48 e 168 horas. A análise no tempo revelou T°C constante para o grupo Salina e pequenas variações no grupo Halum, enquanto o grupo que recebeu a vacina oleosa teve aumentos de temperatura gradual atingindo seu máximo em 35°C de 24h a 72h. As novilhas vacinadas com Prezent A apresentou pico com 6h e 24h, observando-se diminuição da T°C nos momentos subsequentes.

Após o *booster* os grupos experimentais também apresentaram maiores T°C que àquelas que receberam a solução salina entre 0 e 48 horas, em seguida, as temperaturas da pele tornam-se gradualmente semelhante das novilhas do controle não vacinado.

Tabela 9 - Valores médios em relação a espessura da pele no local da injeção expressos por novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variável		1ª dose				2ª dose			
		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
Espessura pele (mm²)	0h	8 ^b	9 ^e	9 ^e	10 ^{ab}	19 ^{Acb}	22 ^{Ad}	19 ^{Acd}	9 ^{Bbc}
	6h	29 ^{Aa}	29 ^{Acd}	37 ^{Abc}	11 ^{Ba}	34 ^{Bab}	44 ^{ABab}	61 ^{Aa}	11 ^{Cab}
	24h	27 ^{Ba}	61 ^{Aa}	30 ^{Bcd}	10 ^{Cabc}	38 ^{Aa}	49 ^{Aab}	54 ^{Aab}	10 ^{Babc}
	48h	28 ^{Aa}	44 ^{Aab}	31 ^{Acd}	10 ^{Babc}	41 ^{Aa}	50 ^{Aab}	53 ^{Aab}	10 ^{Babc}
	72h	31 ^{Aa}	42 ^{Aacb}	43 ^{Aabc}	10 ^{Babc}	38 ^{Aab}	40 ^{Aab}	49 ^{Aabc}	10 ^{Babc}
	168h	21 ^{Ba}	45 ^{Aab}	42 ^{Aabc}	10 ^{Cabc}	31 ^{Aabc}	38 ^{Acb}	31 ^{Ac}	9 ^{Bbc}
Temp. média (°C)	0h	33 ^{ABa}	34 ^{Aab}	33 ^{ABb}	32 ^{Bbc}	33 ^{Ba}	33 ^{Ba}	35 ^{Aa}	31 ^{Cab}
	6h	34 ^{ABa}	33 ^{Bb}	35 ^{Aa}	31 ^{Cc}	34 ^{Aa}	33 ^{Aa}	33 ^{Ab}	31 ^{Bab}
	24h	34 ^{ABa}	35 ^{Aa}	35 ^{Aa}	33 ^{Bab}	34 ^{Aa}	34 ^{Aa}	34 ^{Aab}	32 ^{Ba}
	48h	34 ^{Aa}	35 ^{Aa}	34 ^{Aab}	32 ^{Bbc}	33 ^{Aa}	33 ^{Aa}	33 ^{Ab}	30 ^{Bb}
	72h	34 ^{ABa}	35 ^{Aa}	33 ^{Bb}	34 ^{ABa}	33 ^{Aa}	33 ^{Aa}	31 ^{Bc}	30 ^{Bb}
	168h	33 ^a	34 ^{ab}	34 ^{ab}	33 ^{ab}	31 ^b	31 ^b	32 ^{bc}	31 ^{ab}

Legenda: (h): horas; letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Figura 18 - Valores médios e desvio padrão em relação a espessura e temperatura (°C) média da pele no local da injeção de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

10.2 REAÇÕES SISTÊMICAS

As reações sistêmicas foram avaliadas por meio de escore de DRB, escore de fezes, temperatura retal e observação de efeitos colaterais associados a reações alérgicas.

Nenhuma novilha deste experimento apresentou efeitos adversos indesejáveis, tais como: reações anafilactóides/anafiláticas e/ou depressão/diminuição da coordenação, após a 1ª e 2ª dose das vacinas.

10.2.1 Temperatura Retal

Os valores médios da temperatura retal em cada um dos grupos experimentais após a vacinação (1ª dose) e *booster* (2ª dose) estão dispostos na tabela 10 e figura 19.

Foi possível observar diferenças entre os tratamentos ($P=0,020$; $P=0,000$) e tempo ($P=0,000$; $P=0,000$), assim com a interação Trt x dia ($P=0,001$; $P=0,030$), respectivamente, após a 1ª e 2ª dose das vacinas e placebo.

A T°C retal foi maior nas novilhas que receberam a vacina contendo o adjuvante Prezent A entre 0 a 48h em relação à vacinação, observando-se similaridade entre as temperaturas e grupos após esses momentos. A análise no tempo demonstrou diminuição da temperatura corporal a partir de 6h no grupo Halum, 24h Oleosa, 48h Prezent A e 6h Salina. Após o *booster*, a temperatura retal das novilhas foi menor no grupo salina em praticamente todos os momentos avaliados, exceto às 168h onde a T°C retal era semelhante nos quatro grupos experimentais. Os pico médio máximo de temperatura observado foi de 38,5°C, 38,7°C e 39 °C para as vacinas Halum, Oleosa e Prezent A, respectivamente, às seis horas após a aplicação do booster

Por fim, foi calculada a correlação de Pearson entre a temperatura média encontrada nas imagens termográficas e a temperatura retal expressas pelas novilhas. Observou-se correlação positiva fraca as variáveis após a 1ª dose ($\rho= 0,426$) e 2ª dose das vacinas e placebo ($\rho= 0,100$).

Tabela 10 - Valores médios e diferenças entre os grupos e tempos em relação a temperatura (°C) retal expressos por novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

		1ª dose			
Variável		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
Temp. retal (°C)	0h	38,7 ^{ABa}	38,6 ^{Ba}	39,0 ^{Aa}	38,5 ^{Ba}
	6h	38,4 ^{Bab}	38,7 ^{ABa}	39,1 ^{Aa}	38,1 ^{Cb}
	24h	38,3 ^{Bb}	38,4 ^{ABab}	38,7 ^{Aa}	38,5 ^{ABa}
	48h	38,4 ^{ab}	38,5 ^{ab}	38,4 ^b	38,3 ^{ab}
	72h	38,4 ^{ab}	38,4 ^{ab}	38,2 ^b	38,3 ^{ab}
	168h	38,4 ^{ab}	38,3 ^b	38,2 ^b	38,2 ^b
		2ª dose			
Temp. retal (°C)	0h	38,5 ^{Aa}	38,5 ^{Aa}	38,6 ^{Aa}	37,8 ^{Ba}
	6h	38,5 ^{BCa}	38,7 ^{ABa}	39,0 ^{Aa}	38,1 ^{Cb}
	24h	38,3 ^{ABab}	38,4 ^{Aab}	38,6 ^{Aa}	38,0 ^{Ba}
	48h	38,2 ^{ab}	38,1 ^{bc}	38,1 ^b	38,0 ^a
	72h	38,1 ^{Ab}	37,9 ^{ABbcd}	38,0 ^{ABb}	37,7 ^{Ba}
	168h	38,0 ^b	37,7 ^d	37,8 ^b	38,0 ^a

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: (h): horas; letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos do mesmo tratamento. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

Figura 19 - Valores médios e desvio padrão em relação a temperatura (°C) retal expressas pelas de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017)

10.2.2 Escore associado à DRB

As frequências (n/%) de novilhas dos grupos Halum, Prezent A, Oleosa e Salina manifestando sinais respiratórios e/ou diarreia estão dispostos na tabela 11. As novilhas não apresentaram reações sistêmicas independente do tratamento empregado, dessa forma estes dados não serão apresentados.

Em relação ao parâmetro tosse observou-se frequências semelhantes entre os grupos experimentais ($P>0,05$). A análise no tempo pelo teste de Cochran's detectou diferença ($P=0,014$) no parâmetro tosse apenas para o grupo que recebeu a vacina oleosa após a aplicação da 1ª dose da vacina, no qual 10% das novilhas manifestaram tosse às 24h, 30% às 72h (30%) e 20% às 168h (20%).

Em relação ao parâmetro secreção nasal foi possível diferenças entre os grupos às 72h ($P=0,051$) após a aplicação da 2ª dose das vacinas, observando-se maior número de novilhas dos grupos Prezent A e Oleosa apresentando esse sinal em relação aos animais que receberam salina e Halum. Diferenças entre as frequências no tempo foram observadas nos grupos de novilhas que receberam a vacina oleosa ($P=0,009$), Prezent A ($P=0,052$) e Salina ($P=0,044$).

Em relação ao parâmetro secreção ocular não foi possível detectar diferenças entre os grupos experimentais ($P>0,05$). A análise no tempo detectou diferenças nas frequências entre 0 e 168h nos grupos Oleosa ($P=0,002$) e Prezent A ($P=0,018$), devido a presença de algumas novilhas apresentando secreção nasal a partir de 24 horas após a aplicação da 1ª dose da vacina. A maioria das novilhas dos grupos Prezent A e Halum também apresentaram secreção ocular entre 48 e 72 horas após o booster, sendo possível detectar diferença no tempo para o grupo Prezent A (0,014).

Em relação aos parâmetros temperatura retal e escore fecal não foi possível detectar diferenças entre grupos e tempos ($P>0,05$).

As comparações múltiplas entre os tempos pelo teste post hoc McNemar com correção de Bonferroni não permitiu a obtenção de diferenças estatísticas em relação aos parâmetros tosse ($P\geq 0,125$), secreção nasal ($P\geq 0,063$), secreção ocular ($P\geq 0,031$), temperatura retal ($P\geq 0,125$) e fezes ($P\geq 0,125$).

A análise da soma do escore respiratório maior ou igual a 5 revelou diferenças entre os grupos às 72 horas após o booster, observando-se maior número de novilhas com doença respiratória nos animais que receberam as vacinas contendo Prezent A e

Oleosa ($P=0,024$). A análise no tempo revelou variações nas frequências nos grupos Prezent A e Salina, observando-se pico de doença respiratória às 48 horas após a aplicação o *booster*. As novilhas que receberam a vacina Oleosa também apresentaram pico de doença respiratórias às 48 h após o *booster* (tabela 11 e figura 20).

Tabela 11 - Frequências (n/%) do escore respiratório, temperatura retal e escore de fezes presentes em novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variáveis		1ª dose					2ª dose				
		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	X ²	Halum	Oleosa	Prezent A	Salina	X ²
Tosse	0h	0/0	0/0	0/10	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	6h	0/0	0/0	1/10	0/0	0,616	1/11	2/20	1/10	0/00	0,677
	24h	0/0	1/10	2/20	0/0	0,377	1/11	2/20	3/30	0/0	0,441
	48h	2/22	0/0	2/20	0/0	0,133	1/11	4/40	1/10	1/17	0,307
	72h	0/0	3/30	1/10	1/17	0,117	1/11	4/40	1/10	0/0	0,199
	168h	1/11	2/20	1/10	1/17	0,915	1/11	2/20	3/30	0/0	0,774
	Cochran's	0,180	0,014	0,940	0,416		0,742	0,193	0,139	0,549	
Secreção Nasal	0h	3/33	5/50	6/60	1/17	0,331	4/44	5/50	6/60	0/0	0,116
	6h	4/44	7/70	6/60	1/17	0,124	7/78	5/50	9/90	3/50	0,169
	24h	5/55	6/60	6/60	2/33	0,722	5/56	8/80	7/70	3/50	0,561
	48h	5/55	6/60	7/70	2/33	0,551	5/56	9/90	10/100	5/83	0,067
	72h	3/33	5/50	6/60	1/17	0,331	6/67	10/100	10/100	4/67	0,051
	168h	6/66	6/60	7/70	3/50	0,865	5/56	7/70	9/90	2/33	0,116
	Cochran's	0,539	0,920	0,974	0,709		0,335	0,009	0,052	0,044	
Secreção Ocular	0h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	0/0	4/40	1/10	1/17	0,117
	6h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	2/22	4/40	2/20	1/17	0,742
	24h	3/33	2/20	0/0	1/17	0,116	2/22	5/50	5/50	2/33	0,546
	48h	2/22	2/20	3/30	1/17	0,926	4/44	8/80	8/80	3/50	0,233
	72h	2/22	0/0	2/20	1/17	0,334	4/44	6/60	6/60	2/33	0,246
	168h	1/11	6/60	4/40	2/33	0,178	3/33	4/40	3/30	1/17	0,808
	Cochran's	0,079	0,002	0,018	0,543		0,218	0,155	0,014	0,649	
Temp. Retal	0h	4/44	1/10	7/70	0/0	0,462	3/33	1/10	3/30	0/0	0,152
	6h	2/22	5/50	4/40	0/0	0,151	1/11	4/40	6/60	0/0	0,462
	24h	0/0	0/0	1/10	1/17	0,151	0/0	0/0	4/40	0/0	0,152
	48h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	72h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	168h	1/11	0/0	0/0	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	Cochran's	0,569	0,344	0,278	0,444		0,101	0,189	0,152	-	
Fezes	0h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	6h	0/0	0/0	0/0	0/0	-	1/11	0/0	1/10	0/0	0,677
	24h	0/0	0/0	0/0	0/0	0,462	0/0	1/10	0/0	0/0	0,416
	48h	3/33	0/0	0/0	2/33	0,190	1/11	0/0	0/0	1/17	0,661
	72h	2/22	1/10	0/0	1/17	0,211	0/0	0/0	0/0	0/0	-
	168h	0/0	0/0	0/0	0/0	0,396	2/22	0/0	0/0	0/0	0,876
	Cochran's	0,093	0,594	-	0,221		0,127	0,156	0,113	0,100	
Escore(soma≥5)	0h	2/22	0/0	1/10	0/0	0,300	1/11	3/30	1/10	0/0	0,356
	6h	1/11	1/10	2/20	0/0	0,677	1/11	3/30	5/50	0/0	0,990
	24h	1/11	1/10	3/30	0/0	0,356	1/11	3/30	4/40	0/0	0,218
	48h	4/44	1/10	2/20	1/17	0,116	1/11	6/60	6/60	2/33	0,024
	72h	2/22	3/30	1/10	1/17	0,725	3/33	5/50	1/10	0/0	0,081
	168h	1/11	3/30	4/40	1/17	0,489	2/22	3/30	3/30	0/0	0,501
	Cochran's	0,472	0,119	0,472	0,629		0,416	0,501	0,044	0,044	

Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

Legenda: (h): horas; Halum (n=9); Oleosa (n=10); Prezent A (n=10); Salina (n=6). X²=teste de Qui-quadrado. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

Figura 20 - Frequências (n/%) da soma ≥ 5 de escore DRB em novilhas antes e após receberem as vacinas contendo diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

10.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

A resposta imune adaptativa foi avaliada pela produção de ACs específicos para BVDV e BoHV-1 por meio do teste de Soroneutralização.

10.3.1 Soroneutralização

Os títulos médios de ($\log_2$) de anticorpos específicos e as taxas de soroconversão (%) para o BVDV e BoHV-1 expressos pelas novilhas Halum, Oleosa, Prezent A e Salina nos dias D0, D21 e D42, assim como as diferenças entre os grupos e tempos estão apresentados na tabela 12 e figura 21.

Foi possível observar interação tripla para os ACs específicos e taxa de soroconversão, em relação aos grupos estudados (0,001), dias (0,001) e Trt x dia (0,001).

Nenhuma das novilhas pertencentes aos grupos vacinados independente da composição das vacinas apresentaram títulos de anticorpos específicos para BVDV no D21. Em relação ao BoHV-1, foi possível a detecção de títulos de ACs específicos apenas nos grupos Halum ($\log_2=3$) e Prezent A ($\log_2=1$) no D21. As taxas de soroconversão observadas foram de 67% (6/9) e 80% (8/10) nas novilhas vacinadas com Halum e Prezent A, respectivamente. Não foi observada soroconversão de nenhuma das novilhas vacinadas com o imunógeno contendo o adjuvante oleoso no D21.

No D42, a média ($\log_2$) de anticorpos específicos contra BVDV foi semelhante entre as novilhas vacinadas com imunógenos contendo Prezent A ($\log_2=5$) e Halum ($\log_2=5$), porém essas respostas foram superiores aos animais vacinados com o adjuvante oleoso ou salina. As taxas de soroconversão foram de 78 (6/9), 40 (4/10) e 10% (1/10), respectivamente, para as novilhas que receberam as vacinas contendo Halum, Prezent A e Oleosa. Em relação ao BoHV-1, observou-se maior intensidade de resposta nas novilhas que receberam vacina contendo o adjuvante Prezent A ($\log_2=6$), seguido do Halum ($\log_2=4$), Oleoso ($\log_2=3,0$) e Salina (0). As taxas de soroconversão observadas foram de 100% para o Prezent A e Halum e 60% para a vacina Oleosa. As novilhas que receberam placebo permaneceram soronegativas para o BVDV e BoHV-1 do D0 ao D42.

As frequências de novilhas com títulos de anticorpos específicos acima dos protetores (≥ 16), estão ilustradas na tabela 8 e figura 9. Observou-se diferenças entre os grupos para as frequência de animais apresentando títulos acima de 16 para o BVDV no D42 ($P=0,010$). As frequências de animais com títulos acima dos protetores para o BVDV foram de 67 e 20% para Halum e Prezent A, respectivamente. As novilhas que receberam a vacina oleosa e salina não apresentaram títulos acima dos protetores.

Em relação ao BoHV-1 observou-se maior frequência de novilhas apresentando títulos acima de 32 no grupo que recebeu a vacina contendo o adjuvante Prezent A (80%, 8/10) em relação a Halum (33%, 3/9), Oleosa (20% 2/10) e Salina (0%) ($P=0,000$).

Tabela 12 - Valores médios de anticorpos específicos para BVDV e BoHV-1 no soro de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Variável		Log ₂			
		Halum	Oleosa	Prezent A	Salina
BVDV	D0	0 ^b	0 ^a	0 ^b	0 ^a
	D21	0 ^b	0 ^a	0 ^b	0 ^a
	D42	5 ^{Aa}	1 ^{Ba}	5 ^{Aa}	0 ^{Ba}
BoHV-1	D0	0 ^c	0 ^b	0 ^c	0 ^a
	D21	3 ^{Ab}	0 ^{Bb}	1 ^{ABb}	0 ^{Ba}
	D42	4 ^{Ba}	3 ^{Ca}	6 ^{Aa}	0 ^{Da}
Soroconversão (%)					
BVDV	D0	0 ^b	0 ^a	0 ^b	0 ^a
	D21	0 ^b	0 ^a	0 ^b	0 ^a
	D42	78 ^{Aa}	10 ^{Ba}	40 ^{Aa}	0 ^{Ba}
BoHV-1	D0	0 ^c	0 ^b	0 ^c	0 ^a
	D21	67 ^{Ab}	10 ^{Bb}	80 ^{ABb}	0 ^{Ba}
	D42	100 ^{Ba}	70 ^{Ca}	100 ^{Aa}	0 ^{Da}
Títulos acima dos protetores (n/%)					
BVDV	D0	0/0 ^b	0/0 ^a	0/0 ^a	0/0 ^a
	D21	0/0 ^b	0/0 ^a	0/0 ^a	0/0 ^a
	D42	6/67 ^{Aa}	0/0 ^{Ba}	2/20 ^{Ba}	0/0 ^{Ba}
BoHV-1	D0	0/0 ^a	0/0 ^a	0/0 ^b	0/0 ^a
	D21	1/11 ^a	0/0 ^a	0/0 ^b	0/0 ^a
	D42	3/33 ^{Ba}	2/20 ^{Ba}	8/80 ^{Aa}	0/0 ^{Ba}

Legenda: (D) dia; letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre tratamentos; letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os tempos do mesmo tratamento. Foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$

Fonte: (BACCILLI, C. C., 2017).

Figura 21 - Valores médios em relação a produção de anticorpos específicos para BVDV e BoHV-1 no soro de novilhas vacinadas com diferentes tipos de adjuvantes – São Paulo – 2017

Fonte: (BACCILI, C. C., 20

11 DISCUSSÃO

A vacinação dos bovinos na fase reprodutiva é uma ferramenta comumente utilizada como forma de prevenir aos prejuízos ocasionados principalmente pelos vírus da BVD e IBR. Grande parte das vacinas comercializadas no Brasil são polivalentes e contém os antígenos inativados ou termossensíveis em suas formulações, sendo assim, os adjuvantes representam papel fundamental para o desenvolvimento da resposta imune. A questão é que os adjuvantes podem promover reações no ponto de injeção e/ou sistêmicas indesejáveis ao animal considerando a sua influência na ingestão de matéria seca e queda na produção leiteira.

11.1 REAÇÕES LOCAIS

As novilhas vacinadas independente da composição das vacinas apresentaram maior reatividade local considerando-se dor, aumento da espessura da pele e temperatura local após a vacinação e *booster*, em relação ao controle não-vacinado.

Os adjuvantes têm sido utilizados por várias décadas para desencadear respostas imunes específicas aos antígenos e aumentar a imunogenicidade das vacinas, e com sua aplicação os sinais cardinais da inflamação são gerados com maior intensidade pelo aumento do fluxo sanguíneo como consequência do aumento do diâmetro vascular (RYMAN et al., 2015). A cascata inflamatória é desencadeada primeiramente por meio dos antígenos vacinais injetados reconhecidos pelas células APC's, sendo a pele um local rico em macrófagos e principalmente células dendríticas (BOS; KAPSENBERG, 1986). O reconhecimento dos PAMPs presentes nos microrganismos se ligam ao TLR's presentes na superfície ou dentro das células. O TLR3 é responsável pelo reconhecimento do BoHV-1, enquanto TLR7 é responsável pelo reconhecimento do BVDV (LEE et al., 2007; MARIN et al., 2016). A partir desta ligação, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α são secretadas nos sítios inflamatórios (CATRON, 2004).

Em relação às diferenças entre as vacinas após a 1ª dose observou-se processo doloroso semelhante às 6 horas, entretanto a intensidade da reação foi maior nos grupos que receberam a vacina oleosa. Em geral, o calor local detectado pela palpação foi intenso nos grupos Oleosa e Present A em relação ao grupo Halum e Salina. O efeito deletério das reações inflamatórias podem ser ocasionados por uma reação local exacerbada e aumento de volume gerando uma liberação aumentada de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α que não irão se ligar apenas aos TLR's das células APC's que as produziram, mas também aos receptores de células vizinhas e migrando para a circulação. Deste modo, as citocinas alcançarão o hipotálamo e outros ramos cerebrais estimulando assim a produção de prostaglandina-E2, substância que induz hipertermia e redução do apetite (CHASE; DANIELS; GARCIA, 2008).

A empresa responsável pela vacina oleosa não forneceu dados complementares em relação a composição exata desse adjuvante. Em geral, as emulsões oleosas exercem sua atividade por meio de mecanismo de depósito e possui a capacidade de formar glóbulos de gordura no local onde a vacina é aplicada (XIANG et al., 2006), essa formação irá induzir a apoptose, necrose celular e uma extensa infiltração de leucócitos no local. Os sinais liberados pelas células apoptóticas e necróticas atraem consideravelmente os fagócitos, tais como células dendríticas ou macrófagos, ao local de administração resultando em maior inflamação (SHEN; YANG, 2012). Fato que permitiu um quadro mais intenso e doloroso em novilhas que receberam o composto oleoso.

Esta pesquisa lançou mão da mensuração cutânea como uma forma de comparar as reações entre as vacinas, permitindo averiguar que principalmente 24h após a aplicação da 1ª dose a vacina oleosa apresentou maior espessura local. Uma super estimulação local não é preconizada na vacinação dos bovinos. Os óleos são mais reativos que aqueles adjuvantes a base de hidróxido de alumínio e saponina. Os danos teciduais gerados pelos óleos pode ser identificado por histologia local, onde podem ser vistos principalmente piogranulomas, infiltrados de neutrófilos íntegros e necróticos, macrófagos epitelióides com citoplasma vacuolizado, e mais externamente, abundante tecido conjuntivo em meio a linfócitos e plasmócitos (LEAL et al., 2014).

A termografia revelou pico precoce de T°C local nas novilhas vacinadas com Present A às 6 horas, enquanto que as novilhas que receberam a vacina oleosa apresentaram pico às 24 horas com temperaturas mais elevadas em relação às demais vacinas até 168 horas após a 1ª dose da vacina. Esta técnica envolve a medição precisa

da radiação infravermelha emitida por um objeto, o que permite que a temperatura da superfície seja determinada (SPEAKMAN; WARD, 1998). A termografia infravermelha permite a observação de diferentes aspectos da fisiologia térmica, lesão e doença; sua grande vantagem é que pode ser utilizada como uma avaliação não invasiva com animais e podem ser aplicado para a verificação do bem-estar animal (STEWART et al., 2008; DALTRO et al., 2017; McMANUS et al., 2015).

Cook et al., (2017) avaliaram o bem-estar por método automatizado de estimativa da distribuição espacial em baias para observar o comportamento de amontoamento de leitões sob condições normais e durante a resposta à vacinação. Por termografia os autores verificaram temperaturas mais elevadas em grupos de animais que apresentaram comportamento de amontoamento nas baias. Nos animais vacinados houve um aumento de temperatura durante o período de 24 horas após a vacinação em comparação com animais controle. Estes dados são condizentes com os achados desta pesquisa em relação as novilhas que receberam adjuvante oleoso. O aumento de temperatura local sugere ter forte inter-relação entre as alterações fisiológicas e o desafio imune vacinal (COOK et al., 2017)

Em relação às diferenças entre as vacinas após o *booster* observou-se maior intensidade da reação dolorosa e aumento de volume nas novilhas vacinadas com composto contendo Present A. A termografia revelou dinâmica semelhante das temperaturas entre as vacinas, observando-se maiores T°C entre 0 e 48 horas, em seguida, as temperaturas da pele tornam-se gradualmente semelhante das novilhas do controle não vacinado.

O Present A é um complexo imunosestimulante potente que pode provocar resposta imune disseminada, incluindo a reação de hipersensibilidade tardia após repetidas aplicações. É válido ressaltar que as novilhas vacinadas com este tipo de formulação apresentaram episódios de altas concentrações dos biomarcadores da inflamação, visto no capítulo 1 desta pesquisa. Este tipo de composição ocasionam reações inflamatórias locais que aumentam a absorção de antígeno e prolongam a estabilidade das glicoproteínas no local. Por outro lado, histologicamente a fração pura da saponina gera toxicidade aos tecidos, granulomas locais, além de hemólise associada à afinidade da saponina com o colesterol (SJÖLANDER; COX; BARR, 1998).

Cibulski et al. (2016) avaliaram a vacinação contra BVDV inativado em camundongos com a saponina em diferentes formulações. 1) fração da saponina extraída de folhas de *Quillaja brasiliensis* (QB-90); 2) formulação de extrato aquoso

(EA) feita a partir de folhas secas da planta ressuspendidas em água destilada (1:10); 3) emulsão oleosa. Os animais foram imunizados nos dias 0 e 14 com antígeno associado ao QB-90, antígeno em extrato aquoso ou uma vacina contendo emulsão oleosa. Os anticorpos IgG, IgG1 e IgG2b anti-BVDV aumentaram significativamente em vacinas adjuvadas com QB-90 e EA. Foram relatadas maior concentração de IFN- γ , produzidas por linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, assim como maiores concentrações de IL-2 (Th1), TNF- α , IL-10 (Th2) e IL-17 (Th17) foram detectados em camundongos que receberam vacina QB-90. A vacina EA estimulou as respostas humorais, mas não as respostas imunes celulares. Assim, o QB-90 foi capaz de estimular as respostas imunes celulares e humorais quando usado como adjuvante.

As vacinas contendo emulsões oleosas e Prezент A apresentaram maior reatividade local que àquelas promovidas pelo hidróxido de alumínio ou controle não vacinado. A avaliação histológica das reações locais complementaríamos estes achados, porém neste estudo não foi possível realizar o procedimento de biópsia à campo.

O desconforto animal após a vacinação está diretamente relacionado ao estresse e dor, resultando em redução na ingestão de alimentos, apatia e queda na produção de leite. As reações inflamatórias intensas podem ocasionar liberação de citocinas, que atuam na glândula pituitária desencadeando a secreção aumentada de aldosterona, cortisol e catecolaminas (CHASE, 2007; ZANELLA et al., 2009). Altas concentrações plasmáticas de cortisol e insulina foram detectadas em novilhas 2 a 16h após serem vacinadas contra DRB. A insulina se eleva durante uma resposta inflamatória com a intenção de amplificar a utilização de energia pelo organismo para restaurar a sua homeostase (RODRIGUES et al., 2015).

11.2 REAÇÕES SISTÊMICAS

Não foi possível detectar diferenças para o escore fecal entre todos os grupos experimentais, em contrapartida a frequência de Doença Respiratória Bovina (DRB) foi maior no grupo de novilhas vacinadas com imunógenos contendo emulsão oleosa e Prezент A às 48 e 72 horas após o *booster*. O escore respiratório têm sido empregado nos sistemas de produção com uma proposta de rastreabilidade e agilidade na identificação dos animais acometidos pela DRB (McGUIRK 2008).

As superproduções de citocinas, também conhecidas como “*cytokine storms*”, podem gerar uma inflamação das vias aéreas. A inflamação local associada a uma tempestade de citocinas pode vir a se expandir por via sistêmica, e assim se distribuir por todo o organismo, podendo atingir outros tecidos, com o pulmão. A IL-6 e IL-1 β que exerce sua função pró-inflamatória, em altas concentrações é facilmente encontrada em lavados broncoalveolares em pacientes com lesão pulmonar (TISONCIK et al., 2012). A lesão pulmonar aguda é uma consequência comum desta produção exacerbada em humanos (RUBENFELD, et al., 2005). Mensurações séricas destas citocinas nas novilhas vacinadas no presente estudo, elucidaria a esta possível hipótese.

Em geral, a temperatura retal das novilhas vacinadas foi maior que do grupo controle nas primeiras 24 horas após a 1ª e 2ª doses, porém os picos máximos de temperatura retal foram observados no grupo Present A. Provavelmente, este adjuvante induziu inflamação local intensa com a liberação exacerbada das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que não se ligaram apenas aos receptores TLR's das células APC's que as produziram, mas também às células vizinhas. O efeito parácrino das citocinas pode desencadear resposta inflamatória mais generalizada. As citocinas pró-inflamatórias circulantes alcançam o hipotálamo e outros ramos cerebrais, estimulando a produção de prostaglandina-E2, substância que induz hipertermia (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Na medula óssea as citocinas agem de forma que as células do estroma e macrófagos ocasionem a liberação da glicoproteína fator estimulador de colônias de granulócitos (*G-CSF-Granulocyte-colony stimulating factor*), e a produção adicionais de leucócitos necessários para o desenvolvimento da resposta imune (CATRON et al., 2004).

Em relação aos efeitos colaterais indesejáveis, não foram relatados nenhum caso de reação alérgica em novilhas vacinadas, porém este tipo de efeito são comumente observados a campo. Os traços observados no leucograma poderiam levar as novilhas à estes possíveis efeitos, no capítulo 1 foram observados um conjunto de informações que podem sugerir que a formulação de Present A apresentou maior reatividade nos valores de hemácias, hemoglobina, basófilos (%) e eosinófilos (%) principalmente após a 2ª dose. A saponina é um composto altamente reativo, é visto que algumas frações deste composto podem causar aumento da atividade hemolítica e maiores concentrações de IgE (SJÖLANDER; COX; BARR, 1998). Este tipo de perfil inflamatório predispõe os animais a manifestarem processos alérgicos, além de

maiores riscos de reações sistêmicas conforme o números de doses (MARTINOD, 1995).

11.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Nesta pesquisa a média dos títulos de anticorpos específicos contra BVDV foram semelhante entre as novilhas vacinadas com imunógenos contendo os adjuvantes Halum e Prezent A. A vacina oleosa apresentou títulos de anticorpos contra o BVDV semelhante ao placebo. As taxas de soroconversão foram de 78 (6/9), 40 (4/10) e 10% (1/10), respectivamente, para as novilhas que receberam as vacinas contendo Halum, Prezent A e Oleosa.

O adjuvante a base de hidróxido de alumínio destacou-se nesta pesquisa por apresentar outros mecanismos de ação, além do sei efeito depósito no local da injeção. O hidróxido de alumínio tem como funcionalidade a capacidade de reter as partículas antigênicas e com isso aumentar a internalização das partículas virais pelas células dendríticas, amplificando e modulando a resposta imune humoral do tipo Th2 (MOREFIELD et al., 2005; AIMANIANDA et al., 2009).

A baixa imunogenicidade das vacinas nacionais inativadas contra o BVDV já foi relatada em estudos prévios da equipe. Baccilli et al. (2017) avaliaram a resposta vacinal de vacas no pré-parto e sua influência na transferência de imunidade passiva, sendo possível verificar que apenas duas de seis vacas vacinadas soroconverteram após a vacinação.

Anziliero et al. (2015) analisaram oito vacinas disponíveis no mercado para a Diarreia Viral Bovina (BVDV-1, BVDV-2) por meio da avaliação da sorconversão dos animais. Os autores verificaram que os animais imunizados com a vacina contendo Prezent A apresentaram 100% de soroconversão com títulos moderados a altos, fato distinto daqueles encontrados neste estudo, pois apenas 40% das novilhas soroconverteram. A grande variabilidade antigênica do vírus e a existência de dois tipos antigênicos distintos (BVDV-1 e BVDV-2), cuja reatividade sorológica cruzada é baixa são considerados obstáculos para o sucesso da vacinação (RIDPATH et al., 1994).

Em conjunto, outras questões que podem ter influenciado para a soroconversão, tais como estresse térmico e manejo alimentar. Esta pesquisa foi realizada entre as estações outono/verão, o excesso de calor ou frio podem desencadear algum tipo de estresse, que implicará na eficiência da resposta imune (CARROL et al., 2012). Além disso, o sistema imunológico requer energia, proteínas, vitaminas e minerais para exercer sua função. A principal fonte de alimento é a pastagem, porém grande parte são deficientes e não proporcionam aos animais o consumo ideal destes elementos (ORTOLANI; SUCUPIRA, 2010). Dentre os "microminerais imunes" mais importantes para nossa pesquisa se destaca o zinco (Zn), que está diretamente relacionado a síntese de proteínas, formação de anticorpos, diferenciação celular, integridade da pele e mucosa, ou seja, essencial para as respostas imunes inatas e humoral (PALOMARES et al., 2016).

Em relação ao BoHV-1, observou-se maior intensidade de resposta nas novilhas que receberam vacina contendo o adjuvante Prezent A. As taxas de soroconversão observadas foram de 100% para o Prezent A, 70% para Halum e 60% para a vacina Oleosa. Provavelmente este fenômeno ocorreu pelos diferentes tipos de vacina considerando-se que somente a Prezent A possuía o BoHV-1 vivo modificado. As vacinas vivas são mais potentes que as compostas por vírus inativado, devida a capacidade do antígeno se replicar nas células do animal (VARTAK; SUCHECK, 2016).

Silva, Weiblen e Flores, (2007) avaliaram a imunogenicidade de seis vacinas comerciais contendo antígenos inativados de BoHV-1: uma brasileira (BR), uma norte-americana (US), duas uruguaias (UR1 e UR2) e duas argentinas (ARG1 e ARG2). Apenas a vacina US apresentaram 87,5% dos animais com títulos acima dos protetores. As demais vacinas apresentaram títulos inferiores a 16 em 62,5% (5/8, BR), 33,3% (4/9, UR1), 75% (6/8, UR2) e 83,3% dos bezerros (5/6, ARG2). A vacina ARG1 apresentou performance ainda inferior, apenas três animais (37,5%) soroconverteram, ainda assim em títulos baixos.

A resposta imune humoral (Th2) investigada nesta pesquisa é fundamental para o aumento nos títulos de anticorpos com o objetivo de neutralizar o antígeno, antes que o mesmo colonize os órgãos-alvo. Por outro lado, a resposta imune celular Th1 mediada pelos linfócitos citolíticos (CD8⁺) é importantíssima para a proteção contra os agentes virais, pois essa célula secreta IFN- γ e TNF- β que recrutam células inflamatórias, como as células *Natural Killer* (NK). O IFN- γ produzido pelas TCD8⁺ e NK possui ação nas infecções virais por meio da inibição do crescimento de células

infectadas e apoptose, restringindo assim a propagação do vírus, além de auxiliar na memória vacinal (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; CHASE et al., 2008). Além disso, os linfócitos TCD8⁺, componentes citotóxicos como as perforinas, que possuem a capacidade de induzir a formação de poros na célula-alvo, além de granzimas, que penetram nas células por meio dos poros e ativam mecanismos intracelulares que culminam com a morte programada da célula infectada por microrganismos intracelulares (KREUTZ et al., 2012).

Nesta pesquisa as vacinas contendo emulsão oleosa produziu efeitos adversos exacerbados e apresentou fraca resposta humoral contra o BVDV e BoHV-1; a vacina contendo hidróxido de alumínio causou menos efeitos colaterais associadas à melhor produção de anticorpos contra o BVDV, porém sabe-se que esse adjuvante é um imunomodulador da resposta imune Th2 que possui pouco efeito em relação à imunidade mediada por células; e a vacina contendo o adjuvante Prezent A apresentou intensa reatividade local e sistêmica, especialmente após a 2ª dose da vacina, associada aos maiores títulos para o BoHV-1. Sabe-se que o Prezent A é um *ISCOM* que potencializa a resposta imune mediada por células, porém essa via da resposta imune não foi avaliada na presente pesquisa. Sendo assim, são necessárias pesquisas futuras para associar o efeito sistêmico do Prezent A com a resposta imune do tipo Th1.

O adjuvante ideal seria um composto que promovesse uma melhor resposta imune específica ao antígeno vacinal refletida pelo desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, além de amplificar a resposta imune mediada por células com fraca ou nenhuma irritação no local da injeção (RIDPATH et al., 2010). Observando-se os dados desta pesquisa pode-se dizer que o adjuvante ideal está longe de existir no Brasil e demais países, porém destacamos que o “mal (efeitos adversos) nem sempre foi necessário” considerando-se a resposta da vacina oleosa.

12 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos pode-se concluir:

- a) As novilhas que receberam vacina com emulsão oleosa apresentaram reações adversas exacerbadas no local da injeção, além de resposta sistêmica, porém com fraca resposta imune humoral especialmente contra o BVDV;
- b) As novilhas que receberam vacina com hidróxido de alumínio geraram menor reatividade no sítio da injeção e reações sistêmicas, associada com melhor produção de anticorpos contra o BVDV;
- c) As novilhas que receberam a vacina com Present A apresentaram reações adversas locais e maior reatividade sistêmica associada à maior produção de anticorpos contra o BoHV-1.

REFERÊNCIAS

- AIMANIANDA, V.; HAENSLER, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 6, p. 287–295, 2009.
- ANZILIERO, D.; MARTINS, M.; WEISS, M.; MONTEIRO, F. L.; ATAIDE, C. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58–63, 2015.
- AONO, F. H.; COOKE, R. F.; ALFIERI, A. A.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 242–248, 2013.
- BACCILI, C. C.; SILVA, C.C.P.; BALDACIM, V.A.P.; GREGHI, G.; RIBEIRO, C. P.; GOMES, V. Influência da vacinação materna na transferência de imunidade passiva contra as viroses respiratórias dos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (prelo), 2017.
- BALDRICK, P. Dose site reactions and related findings after vaccine administration in safety studies. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 980–990, 2016.
- BRASIL. Coordenação de fiscalização de produtos veterinários. Relatório de produtos com licença Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/arquivos-comunicacoes-e-instrucoes-tecnicas/ProdutosVigentesAbril2014.pdf>>. Acesso em: 06 nov 2017a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Calendário de vacinas obrigatórias 2017. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/copy3_of_CalendriodeVacinao_mar_2017.pdf. Acesso em: 14 set 2017b.
- CATRON, D. M.; ITANO, A. A.; PAPE, K. A.; MUELLER, D. L.; JENKINS, M. K. Visualizing the first 50 hr of the primary immune response to a soluble antigen. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 341–347, 2004.
- CHASE, C. C. Immunology Review/Refresher with Emphasis on Vaccinology. **AABP conference - American Association of Bovine Practitioners**, v. 40, 2007.
- CHASE, C.; DANIELS, C.; GARCIA, R. Needle-free injection technology in swine: Progress toward vaccine efficacy and pork quality. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, n. 5, p. 254–261, 2008.
- CIBULSKI, S. P.; SILVEIRA, F.; MOURGLIA-ETTLIN, G.; TEIXEIRA, T. F.; DOS SANTOS, H. F.; YENDO, A. C.; DE COSTA, F.; FETT-NETO, A. G.; GOSMANN, G.; ROEHE, P. M. Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular

responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 1–8, 2016.

COOK, N. J.; BENCH, C. J.; LIU, T.; CHABOT, B.; SCHAEFER, A. L. The automated analysis of clustering behaviour of piglets from thermal images in response to immune challenge by vaccination. **Animal**, p. 1–12, 2017.

CORTESE, V. Immunology and Vaccination of Dairy Cattle. **Dairy Production Medicine**, p. 165-171, 2011.

DALTRO, D. S.; FISCHER, V.; ALFONZO, E. P. M.; DALCIN, V. C.; STUMPF, M. T.; KOLLING, G. J.; DA SILVA, M. V. G. B.; MCMANUS, C. Infrared thermography as a method for evaluating the heat tolerance in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 374–383, 2017.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012.

GOMES, Renata Caminha. **Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal**. 145f. Tese de Doutorado em Clínica Veterinária. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2016.

HEEGAARD, P. M. H.; DEDIEU, L.; JOHNSON, N.; LE POTIER, M. F.; MOCKEY, M.; MUTINELLI, F.; VAHLENKAMP, T.; VASCELLARI, M.; SØRENSEN, N. S. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: Current state and future developments. **Archives of Virology**, v. 156, n. 2, p. 183–202, 2011.

KREUTZ, Luiz Carlos. Resposta imunológica contra vírus. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 237-261, 2012.

LEAL, P. V.; PUPIN, R. C.; SANTOS, A. C.; FACCIN, T. C.; SURDI, E.; LEAL, C. R. B.; BRUMATTI, R. C.; LEMOS, R. A. A. Estimativas de perdas econômicas causadas por reação granulomatosa local após uso de vacina oleosa contra febre aftosa em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 738–742, 2014.

MARTINOD, S. Risk assessment related to veterinary biologicals: side-effects in target animals. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 14, p. 979-990, 1995.

MCGUIRK, Sheila M. Disease management of dairy calves and heifers. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 139-153, 2008.

McMANUS, C.; BIANCHINI, E.; PAIM, T. do P.; DE LIMA, F. G.; NETO, J. B.; CASTANHEIRA, M.; FERREIRA ESTEVES, G. I.; CARDOSO, C. C.; DALCIN, V. C. Infrared thermography to evaluate heat tolerance in different genetic groups of lambs. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 7, p. 17258–17273, 2015.

MOREFIELD, G. L.; SOKOLOVSKA, A.; JIANG, D.; HOGENESCH, H.; ROBINSON, J. P.; HEM, S. L. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. **Vaccine**, v. 23, n. 13, p. 1588–1595, 2005.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: ArtMed, 7ª edição. 2010.

NEWCOMER, B. W.; CHAMORRO, M. F.; WALZ, P. H. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 206, p. 78-83, 2017.

ORTOLANI, E. L.; SUCUPIRA, M.C.A. Deficiências de macro e microelementos em gado de corte. In: Alexandre Vaz Pires. (Org.). **Bovinocultura de Corte**. 1ed. Piracicaba: FEALQ, v. 1, p. 351-37, 2010.

PALOMARES, R. A.; HURLEY, D. J.; BITTAR, J. H. J.; SALIKI, J. T.; WOOLUMS, A. R.; MOLIERE, F.; BARBER, C. E. Effects of injectable trace minerals on humoral and cell-mediated immune responses to Bovine viral diarrhea virus, Bovine herpes virus 1 and Bovine respiratory syncytial virus following administration of a modified-live virus vaccine in dairy calves. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 178, p. 88-98, 2016

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J. F.; DOMINOWSKI, P.; MANNAN, R.; YANCEY, R.; JACKSON, J. A.; TAYLOR, L.; MEDIRATTA, S.; EVERSOLE, R.; MACKENZIE, C. D.; NEILL, J. D. Evaluation of three experimental bovine viral diarrhea virus killed vaccines adjuvanted with combinations of Quil A cholesterol and dimethyldioctadecylammonium (DDA) bromide. **Veterinary research communications**, 34(8), 691-702, 2010.

RODRIGUES, M. C.; COOKE, R. F.; MARQUES, R. S.; CAPPELLOZZA, B. I.; ARISPE, S. A.; KEISLER, D. H.; BOHNERT, D. W. Effects of vaccination against respiratory pathogens on feed intake, metabolic, and inflammatory responses in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 9, p. 4443–4452, 2015.

ROTH, James A. Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. **Advances in veterinary medicine**, v. 41, p. 681-700, 1999.

RUBENFELD, G. D.; CALDWELL, E.; PEABODY, E.; WEAVER, J.; MARTIN, D. P.; NEFF, M.; HUDSON, L. D. Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685-1693, 2005.

RYMAN, V. E.; PACKIRISWAMY, N.; SORDILLO, L. M. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 2, p. 135–149, 2015.

- SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 289-299, 2005.,.
- SHEN, S. S.; YANG, Y. W. Antigen delivery for cross priming via the emulsion vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 30, n. 9, p. 1560–1571, 2012.
- SILVA, L. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1471–1474, 2007.
- SIVAKUMAR, S. M.; SAFHI, M. M.; KANNADASAN, M.; SUKUMARAN, N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 197–206, 2011.
- SJÖLANDER, A; COX, J. C.; BARR, I G. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 6, p. 713-723, 1998.
- SPEAKMAN, J. R.; WARD, S. Infrared thermography: principles and applications. **ZOOLOGY-JENA-**, v. 101, p. 224-232, 1998
- STEWART, M.; WEBSTER, J. R.; AL, S.; STAFFORD, K. Infrared thermography and heart rate variability for non-invasive assessment of animal welfare. **The Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching**, v. 21, n. 1, p. 1–3, 2008.
- TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C. P.; FARRAR, J.; MARTIN, T. R.; KATZE, M. G. Into the eye of the cytokine storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16-32, 2012.
- VAN DONKERSGOED, J.; BABIUK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory VARTAK, A.; SUCHECK, J. Recent advances in subunit vaccine carriers. **Vaccines**, v. 4, n. 2, p. 12, 2016.
- WALZ, P. H.; GIVENS, M. D.; RODNING, S. P.; RIDDELL, K. P.; BRODERSEN, B. W.; SCRUGGS, D.; SHORT, T.; GROTELUESCHEN, D. Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live vi. **Vaccine**, v. 35, n. 7, p. 1046–1054, 2017.
- XIANG, S. D.; SCHOLZEN, A.; MINIGO, G.; DAVID, C.; APOSTOLOPOULOS, V.; MOTTRAM, P. L.; PLEBANSKI, M. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2006.
- ZANELLA, R., THOMAZI, G., GUIZZO JUNIOR, N., SPAGNOLO, J. D., DAMBRÓSIO GUIMARÃES, L.; VELOSO BRUN, M. Cortisol plasmático como indicador de estresse em colopexias laparoscópicas com implante de tela de polipropileno em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 231–237, 2009.

APÊNDICE 1

Apêndice 1 – Manejo reprodutivo das fêmeas selecionadas adotadas pela fazenda APTA – gado de leite durante o período experimental– São Paulo – 2017

ID animal		Data de Nascimento	Idade em meses	ID Lote	Diagnóstico reprodutivo
1	1601	15/10/2013	24	Maracanã	90 dias de prenhez
2	1608	22/10/2013	24	Maracanã	90 dias de prenhez
3	1609	22/10/2013	24	Maracanã	IA 05/10/15
4	1610	23/10/2013	24	Maracanã	IA 05/10/15
5	1612	23/10/2013	24	Maracanã	90 dias de prenhez
6	1616	25/10/2015	24	Maracanã	90 dias de prenhez
7	1617	25/10/2013	24	Maracanã	Sem protocolo
8	1620	27/10/2013	24	Maracanã	IA 05/10/15
9	1622	27/10/2013	24	Maracanã	90 dias de prenhez
10	1623	27/10/2013	24	Maracanã	90 dias de prenhez
11	1625	30/10/2013	24	Palmeira	Sem protocolo
12	1626	23/11/2013	23	Maracanã	IA 05/10/15
13	1628	02/12/2013	23	Maracanã	IA 05/10/15
14	1634	07/12/2013	23	Maracanã	Sem protocolo
15	1637	15/12/2013	23	Maracanã	Sem protocolo
16	1640	30/03/2014	20	Maracanã	Sem protocolo
17	1642	03/04/2014	19	Maracanã	Sem protocolo
18	1643	06/04/2014	19	Maracanã	Sem protocolo
19	1648	13/05/2014	18	Maracanã	Sem protocolo
20	1652	16/06/2014	17	Maracanã	Sem protocolo
21	1658	13/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
22	1659	15/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
23	1660	17/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
24	1661	18/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
25	1662	19/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
26	1664	20/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
27	1665	22/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
28	1670	31/10/2014	16	Palmeira	Sem protocolo
29	1671	24/11/2014	15	Palmeira	Sem protocolo
30	1673	27/11/2014	15	Palmeira	Sem protocolo
31	1674	29/11/2014	15	Palmeira	Sem protocolo
32	1676	30/11/2014	15	Palmeira	Sem protocolo
33	1677	03/12/2014	14	Palmeira	Sem protocolo
34	1679	05/12/2014	14	Palmeira	Sem protocolo
35	1680	05/12/2014	14	Palmeira	Sem protocolo

Legenda: ID: identificação das novilhas; IA: inseminação artificial.
 Fonte: (BACCILI, C. C., 2017).

ANEXOS

ANEXO A – Tris Cloreto Amônia (NH₄Cl)

- Tris-NH₄Cl

Adicionar 1mL de 0,1M de tris para 100mL de 0,85% NH₄Cl

Filtrar tudo em Millex® 0,22

Estocar a 4°C

- 0,1 M Tris (SOLUÇÃO ESTOQUE)

Adicionar 1,21g do Tris em 85mL de água destilada

Ajustar pH 7,3 com HCl

Depois ajustar para solução final de 100mL com água destilada

Estocar a 4°C

- 0,85% NH₄Cl (SOLUÇÃO ESTOQUE)

Dissolver 4,25g de NH₄Cl em um volume final de 500mL de água destilada

Filtrar e esterilizar cada componente utilizado

Estocar a 4°C

ANEXO B – Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (Concentrado)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	26,79g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,14g
NaCl	82g
Água destilada.....	1000mL

PBS uso: 1 PBS 10x: 9 de água destilada

ANEXO C – Azul de Tripan (0,4%)

Azul de Tripan.....2g

PBS.....50mL

Solução de uso

1mL da solução estoque para 4mL de PBS - acondicionar geladeira e proteger da luz solar.

ANEXO D – RPMI suplementado p/ 500mL

L. glutamina (2mM)	0,146g
Soro Fetal Bovino (10%).....	50mL
Penicilina (60µg/mL)	3mL
RPMI Sem fenol vermelho ¹⁸	500mL
Suplementar o RPMI em capela de fluxo para evitar contaminação	

¹⁸ RPMI 1640 sem fenol vermelho, Sigma®