CAMILA COSTA BACCILI

Imunização passiva e ativa de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)

São Paulo
2013

CAMILA COSTA BACCILI

Imunização passiva e ativa de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profª. Drª. Viviani Gomes

De acordo:_____

Orientadora

São Paulo
2013

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra 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.2918
FMVZ

Baccili, Camila Costa
Imunização passiva e ativa de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) / Camila Costa Baccili. -- 2013.
124 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Viviani Gomes.

1. Bezerros. 2. Imunização passiva. 3. Vacinação. 4. Vírus da Diarreia Viral Bovina. 5. Herpesvírus bovino. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Resposta imune mediada por células no colostro e sangue de bezerros neonatos. Influência da vacinação materna para o vírus da diarréia viral bovina (VDVB)", protocolado sob o nº 2305/2011, utilizando 20 (vinte) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Viviani Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Cell-mediated immune response in colostrum and blood of neonate calves. Influence of maternal vaccination against bovine viral diarrhea vírus (BVDV)", protocol number 2305/2011, utilizing 20 (twenty) cattle, under the responsibility Profa. Dra. Viviani Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

Of. CEUAVET nº 38/FMVZ/2012
rcg

São Paulo, 24 de fevereiro de 2012.

À senhora
Profa. Dra. Viviane Gomes

Assunto: Projeto nº 2574/2012, intitulado "Desenvolvimento da resposta imune específica em bezerros e sua influência na resposta vacinal ao vírus da diarréia viral bovina".

Senhora Professora,

A Comissão de Ética no uso de Animais desta Faculdade, em reunião realizada no dia 15/2/2012, analisou o projeto acima mencionado e solicita a Vossa Senhoria esclarecimentos sobre o termo de consentimento do IZ o qual autoriza o uso de 10 bezerros, porém o projeto de pesquisa afirma que 36 serão utilizados.

Atenciosamente,

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BACCILI, Camila Costa

Título: Imunização passiva e ativa de bezerros para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

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

Data: ____ / ____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho...

À Deus que me concedeu a cada amanhecer uma incrível força para que eu não pudesse desanimar diante dos obstáculos vividos, me trazendo sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e proteção em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amado marido, inspiração de todos os dias, sem amor não existe luta e sem luta não há vitória!

Aos meus queridos pais e irmãos que são a melhor parte de mim!

À minha sábia orientadora que de uma forma ímpar sempre acreditou e confiou em meu potencial, cada fase desta pesquisa foi construída com muita dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelas inúmeras oportunidades de aprimoramento para que eu pudesse consolidar minha profissão.

Professora Dra. Viviani Gomes, este momento parecia estar tão distante, mas enfim chegou! Momentos como estes nos permitem parar, refletir e finalmente agradecer a cada passo dado, por cada motivação transmitida através da sua força de trabalho e amor pelo o que faz. Te admiro muito, e sei que ainda tenho um caminho longo a percorrer, mas você me permitiu crescer de uma maneira que será para o resto da vida. Serei eternamente grata ao seu companheirismo, pelos grandes ensinamentos, broncas e risadas! Meus sinceros agradecimentos de um muito obrigada por tudo, por me aceitar em sua vida e como sua primeira orientada de mestrado!

Aos meus grandes companheiros de equipe Cynthia Costa, Vinicius Baldacim, Sylvia Novo e Bruno Toledo. Agradeço demais ao apoio dado, em cada fase desta pesquisa existe a dedicação e empenho de cada um, tenho imenso carinho e orgulho de fazer parte desta grande família!

À Profa. Dra. Karina Medici, sua consideração e respeito pelo nosso trabalho, a torna mais querida ainda.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Guilherme Vasconcelos, Renata Leite, Raquel Marques, Stephanie Blima, Juliana Reis e Ariana Henklein que deram sua contribuição nas inúmeras tarefas executadas.

Ao Prof. Dr. Fernando José Benesi que esteve sempre presente, é uma honra poder conviver com este profissional referência na Medicina Veterinária.

Á Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera com sua extensa sabedoria e alto astral, faz a grande diferença na universidade.

À Profa. Dra. Cristina Massoco, com todo seu conhecimento à citometria de fluxo, nos auxiliou prontamente em todos os momentos de dúvidas.

Ao ilustre diretor da FMVZ/USP Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani e aos professores do Departamento de Clínica Médica: Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Profa. Dra. Lilian

Gregory, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Hagiwara, Dra. Raquel Yvona Arantes Baccarin, Profa. e Profa. Dra. Silvia Regina Ricci, Prof. Dr.Wilson Roberto Fernandes.

Ao Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto biológico, principalmente à pesquisadora Edviges Maristela Pituco e toda sua equipe.

Ao Instituto de Zootecnia (APTA. Gado de leite) por terem permitido grande parceria com a equipe da Profa. Dra. Viviani Gomes, muito obrigada Cláudia Pozzi, Juliana Pozzi e Mariana Miranda.

À toda equipe de Laboratório da FMVZ/USP, Cláudia Regina Stricagnolo, Clara Mori, Samantha Ive Miyashiro, Maria Helena da Silva Pelissari, Maria Luisa Franchini, Marly Elizabete Ferreira. Obrigada por terem nos orientado e muitas vezes solucionando muitos de nossas dificuldades na fase de experimento.

À funcionária Edna Santana, com suas cantorias e ajuda com os materiais utilizados.

Aos colegas de pós graduação, torço muito por vocês!

Aos residentes do CBPR: Camila Martin, Bruno Mendonça, Gabriela Reis, Marcela Romanini e Rodrigo Malzoni.

Aos funcionários do CBPR Sr. Edson, Luizinho e Duque.

À FAPESP, por conceder os Auxílios à pesquisa 2010/15685-9 e 2012/02129-8

Sobre tudo o que se deve guardar, guarde o teu coração, porque dele procedem as fontes da vida. Provérbios 4:23

RESUMO

BACCILI, C. C. **Imunização passiva e ativa de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1**). [Passive and active immunization of calves for Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1)]. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a resposta imune (RI) humoral e celular de bezerros recém-nascidos mediante imunização passiva e ativa, usando como modelo o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e o Herpesvírus Bovino tipo-1 (BoHV-1). Esta pesquisa foi dividida em duas etapas e seus dados estão apresentados em dois capítulos. **Capítulo 1-** Acompanhou-se a imunização passiva de bezerros do nascimento até os seis meses de idade e a influência da vacinação materna no período pré-parto nessa resposta. Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais que receberam colostro de mães não imunizadas (G1, n=4) e (G2, n=6) de mães imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1. A colostragem foi feita pela administração de seis litros de colostro nas primeiras doze horas de vida, distribuídas em duas mamadas. Nesta etapa foi possível verificar: (1) a presença de títulos de ACs neutralizantes apenas no grupo de bezerros que receberam colostro de mães imunizadas, obtendo soroconversão após a mamada de colostro em 2/6 (33%) bezerros para o BVDV e 6/6 (100%) para o BoHV-1; (2) manutenção dos títulos de ACs protetores até os três meses de vida. Em relação a RI celular: (3) observou-se maior proporção de células T auxiliares $CD4^+$ (P=0,05) no grupo de bezerros que receberam colostro de mães imunizadas no período pré-parto; (4) o leucograma dos bezerros demonstrou respostas inflamatórias em alguns momentos desta pesquisa, mais intensa nos animais que ingeriram colostro proveniente de mães não-imunizadas. **Capítulo 2-** Acompanhou-se a imunização de bezerros para BVDV e BoHV-1 aos seis meses de idade. Dez bezerros foram distribuídos em dois grupos de bezerros não vacinados (VAC-, n=5) e vacinados para o BVDV e BoHV-1 (VAC+, n=5), as análises foram realizadas antes da imunização aos 180 dias (T0), após a 1°dose aos 210 dias (T1) e após a 2° dose aos 240 dias (T2). Os resultados obtidos para avaliação da RI humoral foram: (1) soroconversão de 2/5 (40%) animais no momento T1 e 3/5 (60%) no T2 para o

BVDV; (2) soroconversão em 2/5 (40%) no T1 e 5/5 (100%) no T2 para o BoHV-1. Para a RI celular observou-se: (3) maior expressão de $CD25^+$ pelas subpopulações de linfócitos T gama-delta $WC1^+$ no VAC^+, observando-se diferença estatística no momento T1 (P=0,0016). Com base nos resultados obtidos nas duas etapas experimentais desta pesquisa pode-se concluir que a vacinação materna é uma estratégia para melhorar a qualidade do colostro e as repostas imunes humoral e celular dos bezerros para BVDV e BoHV-1; a duração da imunidade materna considerando-se níveis protetores de Acs foi de três meses; os componentes do colostro influenciaram na resposta inflamatória dos bezerros à exposição natural aos patógenos; a vacinação dos bezerros aos seis meses de idade estimulou a resposta imune humoral para BoHV-1 e parcial para BVDV.

Palavras-chave: Bezerros. Imunização passiva. Vacinação. Vírus da Diarreia Viral Bovina. Herpesvírus bovino

ABSTRACT

BACCILI, C. C. **Passive and active immunization of calves for Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1).** [Imunização passiva e ativa de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)]. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this research was to evaluate the humoral and cellular immune response (IR) of newborn calves by active and passive immunization, using by model the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Bovine Herpesvirus type-1 (BoHV-1). This research was divided in two stages and the datas are presented in two chapters. **Chapter 1**: Was followed the passive immunization of calves from birth until six months old and the maternal vaccination influence on pre-partum period on this response. The animals were divided in two experimental groups that received colostrum from unvaccinated mothers (G1, n = 4) and (G2, n=6) from immunized mothers in the pre-partum period to BVDV and BoHV-1. The calves received six liters of colostrums on the first twelve hours of life, divided in two feedings. At this stage was verified: (1) the presence of neutralizing titers antibodies (Abs) only in group of calves that received colostrum from immunized mothers, getting seroconversion after feeding in 2/6 (33%) of calves for BVDV and 6/6 (100%) for BoHV-1, (2) maintenance of Abs titers protectors up to three months of life. In relation to immune cellular response: (3) was observed higher proportion of helper T cells $CD4^+$ (P = 0.05) in the group of calves that received colostrum from immunized mothers during pre-partum; (4) the leukogram of calves showed inflammatory responses in some moments of this research, more intense in animals that ingested colostrums from non-immunized mothers. **Chapter 2:** Was followed the immunization of calves for BVDV and BoHV-1 at six months old. Ten calves were divided in two groups of calves non-vaccinated (VAC-, n = 5) and vaccinated for BVDV and BoHV-1 (VAC +, n = 5). The analyzes were performed before immunization at 180 days (T0), after the 1st dose at 210 days (T1) and after the 2nd dose at 240 days (T2). The results for evaluation of immune humoral response were: (1) seroconversion 2/5 (40%) animals at the T1 moment and 3/5 (60%) of T2 for BVDV, (2) soroconversion on 2/5 (40 %) in the

T1 to 5/5 (100%) at T2 for BoHV-1. For the immune cellular response was observed: (3) increased expression of $CD25^+$ subpopulations of T lymphocytes by gamma-delta $WC1^+$ in VAC^+, observing statistical difference in T1 moment (P = 0.0016). Based on the results obtained in the two experimental stages of this research can be concluded that maternal vaccination is a strategy to improve the quality of colostrum and humoral and cellular immune response of calves to BVDV and BoHV-1, the duration of maternal immunity considering protective levels of Abs was three months. The components of colostrum influence the inflammatory response of calves to natural exposure to pathogens. The vaccination of calves at six months old stimulated the humoral immune response to BoHV-1 and partial for BVDV.

Key words: Calves. Passive Immunization. Vaccination, Bovine Viral Diarrhea Virus. Bovine Herpesvirus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos linfócitos B (CD21+) presentes no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para BVDV e BoHV-1, do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)..... 54

Tabela 02 - Títulos médios de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto..... 55

Tabela 03 - Títulos médios de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto..... 56

Tabela 04 - Frequências de animais soropositivos e soronegativos ao BVDV e BoHV-1, que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto..... 58

Tabela 05 - Títulos médios geométricos (GMTs) de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto)..... 60

Tabela 06 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos leucócitos totais e mononucleares do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)..... 62

Tabela 07 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos neutrófilos bastonetes, segmentados e eosinófilos do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)..... 64

Tabela 08 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos linfócitos T (CD3+) do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)..... 68

Tabela 09 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) das subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e WC1+ do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)..... 69

Tabela 10 - Medianas das proporções de células B expressando o marcador CD21+ dentre os leucócitos mononucleares

sanguíneos dos bezerros VAC (+) e VAC (-)..... 100

Tabela 11 - Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos dos grupos Vac (-) e VAC (+) ao BVDV e BoHV-1 após imunização ativa nos momentos T0, T1 e T2..... 102

Tabela 12 - Anticorpos neutralizantes ao BVDV e BoHV-1 no soro sanguíneo de bezerros não-vacinados (VAC -) e vacinados (VAC +) aos seis meses de idade..... 104

Tabela 13 - Log_2 títulos médios geométricos (GMT) e GMTs de Acs neutralizantes no soro de bezerros imunizados (VAC+) para o BoHV- 1 nos momentos T0, T1 T2..... 106

Tabela 14 - Tabela 14- Medianas dos valores relativos (%) dos linfócitos T ($CD3^+$) e suas subpopulações no sangue de bezerros não imunizados (VAC-) e imunizados (VAC+) nos tempos T0, T1 e T2..... 107

Tabela 15 - Medianas dos valores relativos (%) das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ do sangue de bezerros não imunizados (VAC-) e bezerros imunizados (VAC+) após resposta imune primária (T1) e secundária (T2)..... 107

Tabela 16 - Concentrações de IFN-gama (ng/mL) no sobrenadante do cultivo celular dos bezerros dos grupos experimentais VAC (+) e VAC (-) por liberação espontânea e estimuladas com ConA ... 109

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Vacas gestantes, identificação das mães e seus respectivos conceptos de acordo com os grupos experimentais..... 41

Quadro 02 - Constituição dos grupos experimentais..... 45

Quadro 03 - Distribuição das vacas e bezerros de acordo com dos grupos experimentais G1 e G2..... 45

Quadro 04 - Momentos padronizados para colheitas das amostras de sangue e soro no período pós-natal de bezerros neonatos..... 46

Quadro 05 - Anticorpos monoclonais primários usados nas marcações e determinações nas subpopulações de linfócitos B, αβ TCR, γδ TCR..... 48

Quadro 06 - Anticorpos secundários usados nas análises de citometria de fluxo..... 48

Quadro 07 - Ensaios realizados para a determinação das subpopulações e ativação dos linfócitos sanguíneos.....49

Quadro 08 - Bezerros que apresentaram enfermidades nos momentos experimentais..... 53

Quadro 09 - Distribuição dos bezerros do grupo VAC (+) e manutenção grupo controle de animais não-vacinados VAC (-).....87

Quadro 10 - Momentos padronizados para colheitas das amostras de sangue e soro dos bezerros aos 180 dias (T0), 210 dias (T1) e 240 dias (T2) de vida.....89

Quadro 11 - Anticorpos monoclonais primários usados nas marcações e determinações nas subpopulações de linfócitos T (αβ TCR e γδ TCR) e população de linfócitos B..... 90

Quadro 12 - Anticorpos secundários usados para marcação dos Acs monoclonais primários e detecção dos marcadores celulares..90

Quadro 13 - Ensaios realizados para determinação das subpopulações e identificação da expressão de $CD25^+$ nos linfócitos sanguíneos de bezerros dos grupos VAC (-) e VAC (+)..... 91

Quadro 14 - Preenchimento da placa de cultivo celular para avaliação da produção de IFN-gama pelas células mononucleares do sangue dos bezerros dos grupos VAC (-) e VAC (+)..... 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - (a/b) Piquete maternidade onde as vacas gestantes permaneceram no pré-parto; (c) Identificação das vacas gestantes; (d/e) bezerro recém-nascido oriundo de parto noturno ocorrido no piquete maternidade - São Paulo - 2013..... 42

Figura 02 - a/b – Ordenha das vacas no pós-parto imediato para obtenção colostro- São Paulo - 2013..... 43

Figura 03 - a/b – Fornecimento de colostro aos bezerros recém-nascidos com uso de mamadeira e sondagem oro-gástrica- São Paulo - 2013..... 44

Figura 04 - (a) vista externa; (b) Vista interna das baias onde os bezerros ficaram alojados dos 15 p.n até os seis meses de idade - São Paulo - 2013..... 44

Figura 05 - (a) Distribuição das populações de leucócitos sanguíneos de acordo com sua granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) e seleção da população de leucócitos mononucleares; (b) População de linfócitos T sanguíneos identificados pela seleção marcador $CD3^+$ (FL3); (c) Subpopulações de linfócitos T sanguíneos citotóxicos $CD8^+$ (FL1) e auxiliares $CD4^+$ (FL2); (d) Histograma da população de linfócitos T gama-delta expressando o marcador $WC1^+$ (FL-1); (e) Histograma da população de linfócitos B expressando o marcador $CD21^+$ (FL-1) - São Paulo - 2013.....49

Figura 06 - Medianas dos valores relativos e absolutos dos linfócitos B ($CD21^+$) no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013..... 54

Figura 07 - Títulos de Acs neutralizantes para o BVDV obtidos nos animais soropositivos após a mamada de colostro de mães imunizadas no pré-parto (G2) - São Paulo - 2013..... 55

Figura 08 - Títulos de Acs neutralizantes para o BoHV- 1 obtidos nos animais soropositivos após a mamada de colostro de mães imunizadas no pré-parto (G2) - São Paulo - 2013..... 56

Figura 09 - Frequências de animais soropositivos e soronegativos ao BVDV que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto - São Paulo - 2013..... 59

Figura 10 - Frequências de animais soropositivos e soronegativos ao BoHV-1, que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto - São Paulo - 2013..... 59

Figura 11 - Títulos médios geométricos (GMT) – log2 de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães imunizadas (G2) no período pré-parto - São Paulo - 2013.....61

Figura 12 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos ($x10^3/\mu L$) dos leucócitos totais e mononucleares do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013.....65

Figura 13 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos ($x10^3/\mu L$) dos leucócitos segmentados do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013.....66

Figura 14 - Medianas dos valores relativos (%) e absolutos ($x10^3/\mu L$) das populações de linfócitos T e suas populações $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo – 2013.....70

Figura 15 - Aplicação subcutânea de vacina comercial para o BVDV nos bezerros do VAC (+) - São Paulo - 2013.....88

Figura 16 - Passos para determinação da população de células $CD3^+$ usando o Programa Flowjo - São Paulo - 2013.....92

Figura 17 - Passos para determinação das subpopulação de células $CD3^+$, $CD8^{+/}CD25^+$, $CD4^{+/}CD25^+$ e $WC1^+/CD25^+$usando o Programa Flowjo - São Paulo - 2013..... 93

Figura 18 - Passos para determinação da população de células B CD21+ usando o Programa Flowjo - SãoPaulo - 2013.....99

Figura 19 - Camada de leucócitos mononucleares na interface entre o plasma e eritrócitos; (b) Leucócitos momonucleares viáveis obtidos pela separação por gradiente de densidade - São Paulo - 2013.....97

Figura 20 - Medianas das proporções de células B expressando o marcador CD21+ dentre os leucócitos mononucleares sanguíneos dos animais dos grupos VAC (+) e VAC (-) - São Paulo - 2013.....100

Figura 21- Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos dos grupos VAC (-) e VAC (+) ao BVDV após imunização ativa nos momentos T0, T1 e T2 - São Paulo - 2013.....103

Figura 22 - Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos dos grupos VAC (-) e VAC (+) ao BoHV-1 após imunização ativa nos momentos T0, T1 e T2 - São Paulo - 2013.....103

Figura 23 - Títulos de anticorpos neutralizantes ao BVDV no soro sanguíneo dos bezerros vacinados (VAC +) que apresentaram títulos após resposta imune primária (T1) e sedundária (T2) - São Paulo - 2013..... 105

Figura 24 - Anticorpos neutralizantes ao BoHV-1 no soro sanguíneo de bezerros vacinados (VAC +) que apresentaram títulos circulantes após resposta imune primária (T1) e secundária (T2) - São Paulo - 2013..... 105

Figura 25 - Títulos médios geométricos (GMT) de Acs neutralizantes no soro de bezerros imunizados (VAC+) para o BoHV- 1 nos momentos T0, T1 e T2 - São Paulo - 2013.....106

Figura 26 - Medianas dos valores relativos (%) de linfócitos T ($CD3^+$) e suas subpopulações $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ com expressão de $CD25^+$ do sangue de bezerros não imunizados (VAC-) e bezerros imunizados (VAC+) após resposta imune primária (T1) e secundária (T2) - São Paulo - 2013..... 108

Figura 27 - Concentrações de IFN-gama (ng/mL) no sobrenadante do cultivo celular dos bezerros dos grupos experimentais VAC (+) e VAC (-) por liberação espontânea e estimuladas com ConA - São Paulo - 2013..... 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs	Anticorpos
BoHV-1	Herpesvírus Bovino tipo 1
BVDV	Vírus da Diarreia viral Bovina
CONA	Concanavalina A (do inglês: *Concanavalin A)*
CP	Citopático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid)*
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: *Fluorescein Isothiocyanate*)
FTIP	Falha na transferência de imunidade passiva
GMT	Títulos Médios Geométricos (do inglês: *Geometric Mean Titer)*
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (do inglês: *Infectious bovine rhinotracheitis*)
IFN	Interferon
Igs	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LT	Linfócito T
MDBK	Linhagem celular de rim bovino (do inglês: *Madin-Darby Bovine Kidney*)
MEM	Meio Mínimo Essencial (do inglês: *Minimum Essential Medium)*
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal (do inglês: *Major Histocompatibility Complex*
NCP	Não citopatogênica
P.N.	Pós nascimento
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês: *Phosphate Buffered Saline)*
PE	Ficoeritrina (do inglês: *Phycoerythrin*)
PERCP	Peridinina Clorofila-Proteína (do inglês: *Peridinin-Chlorophyll Proteins)*
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic acid*)
SN	Soroneutralização
TCID	Dose infecciosa para culturas de tecidos (do inglês: *Tissue Culture Infective Doses)*

TIP	Transferência de Imunidade Passiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 24

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 26
2.1 DIARREIA VIRAL BOVINA..... 26
2.2 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA..... 29
2.3 DEFICIÊNCIAS NA RESPOSTA IMUNE *VERSUS* SUSCEPTIBILIDADE DO BOVINO JOVEM..... 30
2.4 TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA..... 32
2.5 IMUNIZAÇÃO ATIVA PARA O BVDV E BoHV-1..... 34

CAPÍTULO 1 INFLUÊNCIA DA VACINAÇÃO MATERNA NA TRANFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA CONTRA O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) E HERPESVÍRUS BOVINO TIPO-1 (BoHV-1)..... 36

3 INTRODUÇÃO..... 36

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 40
4.1 SELEÇÃO DA FAZENDA EXPERIMENTAL..... 40
4.2 SELEÇÃO DAS FÊMEAS GESTANTES..... 40
4.3 IMUNIZAÇÃO DAS VACAS (G2)..... 41
4.4 ACOMPANHAMENTO VACAS..... 41
4.5 IMUNIZAÇÃO PASSIVA E MANUTENÇÃO DOS BEZERROS..... 42
4.6 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS..... 45
4.7 COLHEITA DAS AMOSTRAS..... 45
4.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS. 46
4.8.1 Leucograma dos bezerros 46
4.8.2 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos..... 46
4.8.3 Titulação de anticorpos específicos para o bvdv e bohv-1..... 50
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 51

6 RESULTADOS..... 53
6.1 **Avaliação da resposta imune humoral**..... 53
6.2 **Avaliação da resposta imune celular**..... 61
6.2.1 Leucograma..... 61
6.2.2 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos sanguíneos.... 66

7 DISCUSSÃO..... 71
7.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL..... 72
7.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR..... 76

8 CONCLUSÕES..... 81

CAPÍTULO 2 RESPOSTA VACINAL DE BEZERROS AO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) E HERPESVÍRUS BOVINO DO TIPO-1 (BoHV-1)..... 82

9 INTRODUÇÃO..... 82

10 MATERIAL E MÉTODOS..... 86
10.1 SELEÇÃO DE BEZERROS..... 86
10.2 COLOSTRAGEM..... 86
10.3 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO..... 86
10.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS..... 87
10.5 PROTOCOLO DE VACINAÇÃO (VAC +)..... 87

10.6 COLHEITA DAS AMOSTRAS..... 88
10.7 EXAMES LABORATORIAIS..... 89
11 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 98

12 RESULTADOS..... 102
12.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL..... 102
12.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR..... 106
13 DISCUSSÃO..... 112
14 CONCLUSÕES..... 114
15 CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 115
REFERÊNCIAS..... 116
ANEXOS..... 124

1 INTRODUÇÃO

A Diarreia Viral Bovina (BVD) e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), causadas respectivamente pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), são enfermidades cosmopolitas e apresentam extrema importância econômica para a bovinocultura de corte e leite.

Estimativas relataram que as infecções ocasionadas pelo BVDV resultam em perdas econômicas anuais de 760 milhões a 2,2 bilhões de dólares (DRISKELL; RIDPATH, 2006); de 20 a 57 milhões de dólares para cada hum milhão de parições nos Estados Unidos da América - EUA (HOUE, 1999).

O impacto econômico representado pela BVDV e BoHV-1 relaciona-se às perdas decorrentes com gastos em diagnóstico e tratamento, diminuição da produção de leite e carne, transtornos reprodutivos, além das restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos (FRANKEN, 2006; OIE, 2010).

Estudos sorológicos brasileiros demonstraram altas taxas de animais sororreagentes em rebanhos não vacinados para o BVDV (FLORES et al., 2005; FLORES, 2007). Nos Estados de São Paulo/Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e região amazônica maranhense, respectivamente, foram observadas prevalências de 12 a 100%, 64%, 66%, 61,5% de amostras sorologicamente positivas em 88%, 82% e 95% das propriedades avaliadas (DIAS; SAMARA, 2003; QUINCOZES et al., 2007; BRITO et al., 2010; CHAVES et al., 2010). Para o BoHV-1, a prevalência estimada de animais soropositivos no Estado de São Paulo foi de 71,01% (SILVA, 2011; DIAS; SAMARA, 2013).

Dentre as medidas utilizadas no controle do BVDV e BoHV- 1 destacam-se os estudos relacionados às estratégias de imunização passiva e ativa dos bovinos susceptíveis (RIDPATH; BOLIN, 1995; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; KELLING, 2004).

Bezerros recém-nascidos apresentam sistema imune imaturo ao nascimento, devido ao seu crescimento durante o período fetal ocorrer em ambiente uterino estéril, assim, apresentam resposta imune primária aos

patógenos com intensidade fraca e de curta duração (CORTESE, 2009); os hormônios produzidos pela placenta materna, como progesterona, prostaglandina E2 e citocinas IL-4 (interleucina 4) e IL-10 afetam o neonato, suprimindo a resposta imune mediada por células e memória imunológica (Th1), em contrapartida, estes mediadores promovem resposta imune humoral (Th2). Além disso, os altos teores séricos de estrógeno e cortisol materno e fetal também têm efeitos imunossupressivos (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

O amadurecimento do sistema imune dos bezerros dependerá dos desafios antigênicos enfrentados e será equivalente ao animal adulto quando estes bezerros atingirem a puberdade (REBER et al., 2006). Desta forma, a mamada de colostro e a duração da imunidade passiva transferida da mãe ao bezerro são fundamentais para a sua sobrevida, no entanto, a persistência dos anticorpos maternos são variáveis e dependentes do manejo da colostragem, da qualidade imunológica do colostro fornecido e desafios antigênicos do período.

Além das imunoglobulinas, linfócitos e citocinas também podem ser transferidos ao recém-nascido pelo colostro. No entanto, o impacto destas células para a defesa do bezerro recém-nascido ainda é desconhecido e pouco estudado (GOMES, 2008), assim como sua relação com a resposta imune celular de bovinos jovens (LEMAIRE et al., 2000).

A interface imunidade passiva *versus* imunidade ativa em bezerros é um tema controverso, principalmente referindo-se ao momento ideal para a realização da primo-vacinação, considerando-se que a presença de ACs maternos no sangue dos neonatos bloqueiam a imunidade humoral ativa induzida pela vacinação (ELLIS et al., 2001). Em contrapartida, pesquisas recentes tem demonstrado que a resposta imune celular pode ser estimulada pela imunização dos bezerros mesmo em presença de altos títulos de ACs maternos circulantes (ENDSLEY et al., 2003).

A diminuição nos níveis sanguíneos dos componentes maternos transferidos aos recém-nascidos parece predispor os bezerros jovens às infecções causadas pelo BVDV e BoHV-1 ou intensificar a gravidade das síndromes clínicas ocasionadas por esses vírus. Assim, a prevenção destas doenças mediante estratégias que amplifiquem a resposta imune passiva ou a

vacinação precoce dos bovinos jovens são fundamentais para os sistemas de criação pecuária.

Considerando-se os aspectos relacionados à supressão da resposta imune dos bezerros aos vírus e os impactos econômico dos agentes virais na pecuária brasileira, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a resposta imune humoral e celular de bezerros recém-nascidos mediante imunização passiva e ativa, usando como modelo as respostas aos vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo- 1 (BoHV-1).

Este trabalho foi apresentado em dois capítulos, considerando-se os resultados obtidos para a imunização passiva (Capítulo 1) e ativa (Capítulo 2) ao BVDV e BoHV-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1- DIARREIA VIRAL BOVINA

A diarreia viral bovina é causada pelo BVDV, que possui ácido ribonucléico (RNA) como material genético. É um membro do gênero Pestivírus, da família Flaviviridae, classificado tradicionalmente em dois biótipos: não citopatogênico (NCP) e citopatogênico (CP), devido à sua capacidade de produzir citopatologia em cultivo celular (GILLESPIE; BAKER; McENTEE, 1960). São subdivididos em genótipos denominados BVDV- 1 e BVDV- 2, que possuem grande variabilidade antigênica, resultando em diferentes cepas/estirpes (RIDPATH, 2010).

O genoma do vírus é constituído de uma fita simples de RNA com orientação positiva, com 12.500 nucleotídeos. Apresenta duas regiões não traduzidas (“untransleted regions” - UTRs) nas suas extremidades 5’ e 3’ e uma fase de leitura aberta (“open reading frame” – ORF). Esta ORF codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.900 aminoácidos, processada por proteases virais e celulares em 11 ou 12 proteínas maduras durante e após a tradução. Tais genes das proteínas apresentam a seguinte seqüência:

autoprotease N terminal (Npro), proteína do capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E^{RNS}, E1 e E2) e proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (THIEL et al. 1996; LINDENBACH et al., 2007).

A intensidade das manifestações clínicas decorrentes das infecções pelo BVDV depende da cepa viral, imunidade do hospedeiro e a ocorrência de infecções secundárias (LINDBERG, 2003).

Em animais imunocompetentes, infecções por BVDV resultam na formação de anticorpos (Acs) neutralizantes duas a três semanas após a infecção. Estes Acs impedem que o vírus alcance aos órgãos-alvo e feto. Nestes casos, a doença tende a ser branda e transitória, com quadros de depressão, hipertermia, diarreia leve e leucopenia transitória (FINO et al., 2012). Lindberg (2003) relatou que animais imunocompetentes infectados produzem imunidade e proteção fetal nas futuras gestações.

Alguns genótipos e cepas de BVDV são mais patogênicas e resultam em doença grave, na qual os animais infectados desenvolvem leucopenia e trombocitopenia. As manifestações clínicas são observadas seis a sete dias após a infecção, incluindo hipertermia, inapetência, lesões em mucosas associadas com quadros respiratórios e gastrointestinais. A imunossupressão, especialmente relacionada às deficiências nos mecanismos da resposta imune celular, resulta no aparecimento de doenças secundárias (LINDBERG, 2003).

Cepas mais virulentas do BVDV- 1 e BVDV- 2 podem causar quadros severos da Síndrome Hemorrágica (LIEBER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2003; RIDPATH et al., 2000).

Infecções para BVDV em fêmeas prenhas não-imunocompetentes resultam em infecção fetal em 100% dos casos, animais persistentemente infectados (PI), malformações, morte fetal, abortamento em qualquer período da gestação, mumificação, retardo no crescimento fetal, nascimento de bezerros fracos e debilitados (LINDBERG, 2003).

As infecções causadas pelo biótipo NCP no início da gestação, de 40 a 142 dias, originam bezerros imunotolerantes e PI. Estes animais representam a principal fonte de infecção na propriedade, pois eliminam grande quantidade do vírus, porém são soronegativos e clinicamente normais ao nascimento. Os animais PI podem desenvolver doença das mucosas, geralmente fatal ao redor de seis a 18 meses de idade (LINDBERG, 2003). Além disso, foi observada

maior incidência (48%) de doenças respiratórias nos bezerros PI (LONERAGAN et al., 2005; RIDPATH, 2010).

As conseqüências da ação BVDV no sistema imune do hospedeiro resultantes em imunossupressão foram descritas na excelente revisão de literatura apresentada por Chase, Elmowalid e Yousif (2004).

O BVDV infecta células fundamentais ao sistema imune inato e específico, tais como granulócitos, macrófagos, células mielóides apresentadoras de antígeno, linfócitos B, T auxiliar ($CD4^+$) e T citotóxico ($CD8^+$). Infecções de macrófagos pelos biótipos CP ou NCP do BVDV promovem depressão da fagocitose; diminuição da expressão de receptores de imunoglobulinas (Fc) e do sistema complemento; redução da atividade microbicida, pela menor quantidade de radicais do O_2 produzido; diminuição na produção de fatores quimiotáticos e citocinas como o TNF-alfa; e desencadeamento da apoptose em células infectadas e não infectadas. Além disso, macrófagos infectados com o biótipo NC do BVDV apresentam menor produção da citocina IFN-gama, principal citocina com efeitos anti-virais (CHASE, ELMOWALID e YOUSIF, 2004).

A diminuição da habilidade dos macrófagos infectados pelo BVDV na apresentação de antígenos para as células auxiliares ($CD4^+$) resultam em supressão da resposta imune específica. A infecção pelo BVDV possui maior efeito nos linfócitos T caracterizados por linfopenia branda (10-20%) a severa (50-60%). As subpopulações de linfócitos auxiliares $CD4^+$ e citotóxicos $CD8^+$ apresentam marcante diminuição (CHASE, ELMOWALID e YOUSIF, 2004).

Os linfócitos T $CD4^+$ coordenam a resposta imune mediada por células. Estas células respondem, quando estimuladas com as proteínas virais estruturais NS3, E2, E^{rns}, N^{pro} e proteína não estrutural (NS2-3). Células auxiliares infectadas pelo BVDV apresentam maior resposta imune celular do tipo Th1 (2 a 5x). No entanto, o BVDV apresenta mecanismo para desviar a resposta Th1 para a resposta humoral do tipo Th2, que resultam em maiores proporções de células B e interleucina IL- 4; baixas expressão do receptor para IL-2 ($CD25^+$) e nas concentrações das citocinas IL-2 e IFN-gama (CHASE, ELMOWALID e YOUSIF, 2004).

As células T citotóxicas $CD8^+$ também atuam na defesa do hospedeiro ao BVDV. Estes linfócitos são responsáveis pela produção das citocinas IL-2 e

IFN-gama. O MHC de classe I parece apresentar sítios de ligação para as proteínas virais C (capsídeo) E2, E^{rns} e NS2-3, no entanto, esse receptor apresenta expressão diminuída nas infecções pelo BVDV (CHASE, ELMOWALID e YOUSIF, 2004).

A depleção da população de linfócitos B também foi verificada nas infecções pelo BVDV. O vírus contempla quatro principais proteínas estruturais antigênicas, sendo elas: proteína C (capsídeo), glicoproteínas E^{rns}, E1 e E2.

A E^{rns} induz formação de taxas de Acs, porém apresentam baixa atividade neutralizante; a glicoproteína E2 é o alvo antigênico para os ACs, e estimula maiores títulos em animais vacinados ou infectados naturalmente. Antígenos estruturais NS2-3 induzem alta produção de ACs em animais infectados ou vacinados com o vírus vivo modificado, enquanto vacinas inativadas induzem baixa produção de ACs para NS2-3. Altos títulos de ACs neutralizantes previnem o desenvolvimento da doença (NOBIRON et al., 2003).

Mecanismos de resposta celular na prevenção da diarreia das mucosas em animais PI jovens envolvem a subpopulação de linfócitos T gama-delta pelo elevado número dessas proporções celulares durante os primeiros meses de vida de bezerros (BRUSCHKE et al., 1998).

A revisão de literatura apresentada por Chase, Elmowalid e Yousif (2004) justifica o envolvimento do BVDV no “Complexo Doença Respiratória Bovina” e em outras enfermidades secundárias, relacionadas com altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em animais jovens.

2.2- RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

A rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa bovina (IBR/IPV), é causada pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ROIZMAN e PELLETT, 2007).

A IBR é caracterizada como uma intensa reação inflamatória do trato respiratório, acompanhada de dispneia, descarga nasal e depressão. O BoHV-1 possui subtipos 1.1 e 1.2, sendo o subtipo 1.1 o principal causador da IBR e o

1.2, principal causador da vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e da balanopostite pustular infecciosa (IPB) (ROIZMAN et al., 1992).

As manifestações clínicas causadas pelo BoHV-1 são brandas a severas, associadas com quadros respiratórios - rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) ou genitais - vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IBP). Além disso, pode causar conjuntivite e outros distúrbios reprodutivos como morte embrionária e abortamentos (SILVA, 2011).

Levings e Roth (2013) escreveram uma revisão de literatura sobre a imunidade ao herpesvírus bovino tipo- 1, e a consideraram como robusta, intensa e duradoura. Os mecanismos de resposta imune a vírus descritos para o BVDV são semelhantes aos encontrados para o BoHV- 1, envolvendo a atuação de linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) e a formação de ACs neutralizantes para eliminar a infecção e prevenir a re-infecção. Além disso, animais previamente infectados podem proteger seus conceptos via colostro.

O BoHV-1 também possui estratégias para promover imunossupressão no hospedeiro, tais como diminuição da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e apresentação de antígenos; promove morte das células T citotóxicas. Estes mecanismos também favorecem a instalação de outros agentes, desenvolvimento de doenças secundárias e contribui no “Complexo Doença Respiratória Bovina”.

2.3- DEFICIÊNCIAS NA RESPOSTA IMUNE *VERSUS* SUSCEPTIBILIDADE DO BOVINO JOVEM

O crescimento do feto bovino ocorre em ambiente uterino estéril e impermeável a macromoléculas, que implica em imaturidade imunológica e hipogamaglobulinemia ao nascimento. Neste período, o feto conta com a resposta imune inata que é independente da exposição antigênica (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

As alterações hormonais no final da gestação como o aumento de cortisol materno e fetal possuem impacto na resposta imune inata de bezerros recém-nascidos, que implicam na diminuição da fagocitose e atividade

bactericida de neutrófilos e macrófagos. Além disso, neonatos apresentam baixos níveis e redução da atividade dos fatores do sistema complemento; diminuição da atividade funcional das células *Natural Killer;* e menor proporção de células dendríticas (BARRINGTON; PARRISH, 2001; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Os altos teores de progesterona, prostaglandina E2, citocinas IL-4 e IL-10 produzidas pela placenta bovina promovem resposta imune (RI) no neonato pré-termo predominantemente do tipo Th2, envolvidas com a ativação das linhagens de células B e produção de ACs, porém, sua produção de interferon-gama e a RI mediada por células (Th1) apresenta-se suprimida. Além disso, o aumento do estrógeno e do cortisol ao final da gestação causa neutrofilia e linfopenia compatíveis com o leucograma de estresse (MOREIN, ABUSUGRA, BLOMQVIST, 2002; BENESI et al., 2012).

Ao nascimento, o bezerro recém-nascido virgem é transferido de um ambiente uterino estéril e para um exposto aos micro-organismos. Neste momento, sua inabilidade para iniciar resposta imune pode ser atribuída à imaturidade dos mecanismos de proteção e o maior tempo necessário para montar resposta imune humoral e mediada por células (BARRINGTON; PARRISH, 2001). Nesta fase, sua resposta imune é primária e caracterizada por produção de baixas concentrações de imunoglobulinas (Igs) (CORTESE, 2009).

A diminuição dos mecanismos da imunidade adquirida do bezerro recém-nascido é caracterizada pela baixa resposta funcional de linfócitos; possui RI predominantemente Th2, não possuem memória imunológica, as moléculas MHC de classe II encontram-se diminuídas assim como a apresentação de antígenos; e são hipogamaglobulinêmicos ao nascimento (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Do nascimento até a puberdade, poucos foram os estudos que avaliaram o amadurecimento do sistema imune celular de bezerros sadios. Kampen et al., (2006) usando a citometria de fluxo determinaram as subpopulações de linfócitos do sangue de bezerros, do nascimento até os seis meses de idade. Observaram que a população de linfócitos T ($CD3^+$) representa 28% a 34% da população total de linfócitos, além de aproximadamente 10% destes são citotóxicos ($CD8^+$) e 20% são auxiliares

($CD4^+$), adicionalmente, não observaram oscilações entre a quantidade dessas células no período estudado. As células $TCR\gamma\delta^+$ correspondem a 25% do total de linfócitos durante a primeira semana de vida e diminui para 16% entre 19° a 21° semana pós-nascimento.

O número de linfócitos B também está reduzido em bezerros neonatos e representa apenas 4% do total de linfócitos circulantes na primeira semana de vida, bem menor que a proporção de 20 a 30% encontrada em animal adulto. Esse fato resulta na demorada produção de anticorpos endógenos, mesmo que os bezerros tenham resposta predominante Th2. Com o avançar da idade, observa-se aumento da população de células B (KAMPEN et al., 2006).

2.4 TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA

O colostro bovino é composto de fatores nutricionais e elementos imunoprotetores solúveis e celulares, tais como imunoglobulinas (Igs), células e citocinas capazes de conferir imunidade contra uma variedade de micro-organismos patogênicos (GOMES, 2008).

A concentração de IgG, IgA e IgM no colostro de vacas da raça Holandesa de primeira ordenha é de 10.078; 413,8 e 625 mg/dL, respectivamente (GOMES, 2008). A IgG1 representa aproximadamente 90% da IgG, desta forma acredita-se que essa é a principal imunoglobulina envolvida com a transferência de imunidade ao recém-nascido (ELFSTRAND et al., 2002).

Os leucócitos são as células predominantes na secreção mamária (BOUTINAUD; JAMMES, 2002) e no colostro bovino, 69,5% das células presentes correspondem aos monócitos e células epiteliais, 16,4% aos linfócitos, 13,3% aos neutrófilos e 0,27% aos eosinófilos (GOMES et al., 2011). A subpopulação linfocitária é composta por 66,9% de linfócitos T ($CD3^+$) e 24% de linfócitos B ($CD21^+$). Dentro da população de LT, 24,6% são auxiliares ($TCD4^+$) e 26,0% citotóxicos ($TCD8^+$) (BARRINGTON; PARISH, 2001; OHTSUKA et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado a presença de citocinas no colostro bovino, tais como a interleucina 1β (IL-1β), IL-6, fator de necrose tumoral alpha (TNF-α) e interferon-gama (IFN-γ) (YAMANAKA et al., 2001; 2003; MADUREIRA, 2012).

A absorção dos leucócitos do colostro bovino pela mucosa intestinal de bezerros recém-nascidos foi comprovada pelo trabalho de Liebler-Tenório; Riedel-Caspari; e Pohlenz (2002). Atualmente o professor Dr. David John Hurley da *The University of Georgia* tem orientado trabalhos nesta linha de pesquisa (REBER et al,2006; 2008 a, b; DONOVAN et al., 2007). No entanto, os mecanismos envolvendo a presença destas células na resposta imune após imunidade passiva ainda são bem pouco compreendidos.

Segundo a literatura clássica o manejo de colostragem deve ser realizado pelo fornecimento do volume equivalente a 10% do peso vivo dos bezerros nas primeiras doze horas de vida. Quando os neonatos não conseguem absorver quantidades suficientes dos componentes colostrais, apresentam condição imune denominada falha na transferência de imunidade passiva (FTIP).

A FTIP pode ser provocada por diversos fatores, relacionados principalmente à qualidade imunológica, ingestão e absorção inadequada do colostro fornecido, tornando o neonato susceptível a várias enfermidades bacterianas e virais (RADOSTITS et al., 2007). Feitosa et al. (2010) observaram taxas de FTIP em bezerros holandeses correspondentes a 30%.

Pesquisas avaliando a transferência de imunidade passiva ao BVDV e BoHV-1 foram desenvolvidas por vários pesquisadores (RIDPATH, BOLIN, 1995; MENANTEAU-HORTA AMES, JOHNSON 1985; MECHOR et al., 1987; HÜBNER et al., 1996; MOREIRA et al., 2001; GATTI et al., 2010; DONOVAN 2007), porém nenhum dos trabalhos encontrados avaliaram a resposta mediada por células no sangue dos bezerros após a colostragem.

Aspectos particulares da imunização passiva de bezerros recém-nascidos para o BVDV e BoHV- 1 serão apresentados no capítulo 01 desta dissertação.

2.5 IMUNIZAÇÃO ATIVA PARA O BVDV E BoHV-1

Classicamente as vacinas disponíveis no mercado podem ser classificadas em atenuadas (vírus vivo modificado) e inativadas (mortas). Recentemente estão sendo desenvolvidas vacinas “não-replicantes” por questões de biosegurança, dentre elas podem ser citadas aqeuelas contendo proteínas recombinantes, peptídicas, de DNA (ácido desoxiribonucleico) e vetores replicativos não patogênicos. No entanto, a grande variação genética do BVDV pode não ser suficiente para prevenir infecção com genótipos e cepas heterólogas (LINDBERG, 2003).

Genótipos de BVDV- 1 são distintos geneticamente do BVDV- 2 sobretudo na região da glicoproteína E2/gp53, principal proteína do vírion relacionada a indução de Acs neutralizantes e proteção. Este fato alerta para a necessidade da inserção do BVDV- 2, além do BVDV- 1, nas formulações das vacinas para garantia da indução de resposta imune aos dois genotipos. Vogel et al. (2002) demonstraram que a vacinação de animais com imunógenos contendo apenas o BVDV- 1 induziu fraca resposta para formação de ACs neutralizantes para o BVDV- 2.

No Brasil estão registradas 13 vacinas comerciais para BoHV-1 e BVDV, a maioria delas é polivalente e contém cepas apenas do BVDV- 1 (BRASIL, 2013). Outro ponto que merece destaque é a formulação destes imunógenos, que tem como base cepas virais americanas, europeias ou advindas de outros países da América Latina, antigenicamente diferentes das encontradas em território brasileiro (VOGEL et al., 2002).

No Brasil somente é permitida a comercialização de vacinas inativadas para o BVDV devido à sua segurança biológica, pois vacinas vivas possuem capacidade de promover infecção fetal em vacas prenhes e doença em animais imunossuprimidos. No entanto, estes imunógenos possuem como desvantagem uma resposta imune fraca e de curta duração. Vacinas vivas, como algumas comercializadas no Brasil para o BoHV-1, são capazes de produzir resposta imune satisfatória e duradoura, que implica em menor periodicidade de vacinação. No entanto, possuem algumas desvantagens por

proporcionarem falha na estocagem ou acondicionamento equivocado, ou mesmo reversão de virulência (KELLING, 2004).

Algumas pesquisas avaliando a eficácia das vacinas comerciais para o BVDV e BoHV-1 em animais adultos foram desenvolvidas por pesquisadores do sul do Brasil (VOGEL et al., 2002; LIMA et al., 2004; SILVA, 2006), no entanto, particularidades relacionadas aos bezerros no período de transição foram pobremente explorados.

Pesquisas internacionais têm apontado para a realização precoce de vacinação em bezerros, porém ainda existem poucos estudos relacionados ao tema (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). O conhecimento da duração dos ACs maternos na circulação dos bezerros parece ser um ponto fundamental para determinação do período ideal para a vacinação dos bovinos jovens, pois sabe-se que ACs maternos bloqueiam a imunidade induzida pela vacinação mas não a resposta imune celular. Alguns trabalhos foram desenvolvidos estudando essa questão usando vacina viva modificada: Lemaire et al. (2000); Ellis et al. (2001); Fulton et al. (2004); Ridpath et al. (2003), Endsley et al. (2004); Platt et al. (2008) e Platt et al. (2009).

Aspectos particulares da imunização de bezerros jovens para o BVDV e BoHV- 1 serão apresentados no capítulo 2 desta dissertação.

CAPÍTULO 1 INFLUÊNCIA DA VACINAÇÃO MATERNA NA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA CONTRA O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) E HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1)

3 INTRODUÇÃO

Bezerros podem se infectar e desenvolver quadros compatíveis com a diarreia viral bovina (BVD) (PLATT et al., 2009) e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (MOELLER JR et al., 2013), devido ao seu *status* e imaturidade imunológica ao nascimento. Além disso, bezerros recém-nascidos apresentam resposta imune predominantemente humoral (Th2) e supressão da resposta mediada por células, sendo esta última importante na defesa do organismo para agentes virais (BARRINGTON; PARRISH, 2001; MOREIN et al., 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008a, b; CORTESE, 2009).

O despreparo do recém-nascido diante das infecções virais aponta para a necessidade de assistência imunológica imediatamente após o nascimento por meio da administração de colostro materno. A importância dos Acs maternos adquiridos pela mamada de colostro na proteção de bezerros é um consenso (FAGLIARI et al., 1996; FEITOSA et al., 2010). Porém, pesquisas atuais têm demonstrado que outros fatores imunes do colostro, como células e citocinas também são transferidos como parte da imunidade passiva (LIEBLER-TENÓRIO; RIEDEL-CASPARI; POHLENZ, 2002; REBER et al., 2006, 2008a, b).

Apesar do grande número de pesquisas brasileiras sobre a transferência de imunidade passiva aos bezerros recém-nascidos, pouco se conhece sobre os aspectos de imunidade passiva específicos para o BVDV e BoHV- 1 considerando o manejo de colostragem, qualidade do colostro e desafios antigênicos do sistema de criação de bezerros no Brasil.

Ridpath e Bolin (1995) avaliaram três grupos de bezerros, que receberam colostro, substituto do colostro e substituto lácteo, até oito horas (h) pós-nascimento, respectivamente, para obtenção de animais com altos, baixos e ausência de títulos de anticorpos neutralizantes para o BVDV. Os bezerros

foram desafiados com o vírus NCP - estirpe 890 no período compreendido entre 7 a 50 dias de vida. Os bezerros alimentados com substituto do leite/colostro apresentaram ausência ou baixos títulos de anticorpos neutralizantes para o BVDV e manifestaram doença aguda e gave, com hipertermia, leucopenia, trombocitopenia e diarreia. Os bezerros alimentados com colostro apresentaram quadro clínico brando ou não manifestaram a doença.

Menanteau-Horta; Ames e Johnson(1985) relataram que a persistência de Acs maternos para o BVDV é de 180 dias e sua meia vida é de aproximadamente 21 dias. Para o BoHV- 1 pesquisas relataram sua permanência na circulação de bezerros até os seis a sete meses de vida. No entanto, sabe-se que a duração destes ACs depende da qualidade imunológica do colostro fornecido (HÜBNER et al., 1996).

Mechor et al. (1987) verificaram se o consumo de colostro com altas taxas de Acs maternos poderiam proteger bezerros de infecções agudas provocadas pelo BoHV-1. Bezerros alimentados com colostro oriundos de mães vacinadas (títulos colostro = 256-512) e não vacinadas (títulos colostro = 8) apresentaram títulos de Acs neutralizantes correspondentes a 64-256 e 2-4, respectivamente. Esses animais foram desafiados com 48h de vida para o BoHV-1 e todos os bezerros (n=5) de mães não vacinadas morreram ou foram eutanasiados. No grupo soronegativo, os bezerros demonstraram rumenite necrosante aguda, faringite, glossite, esofagite, laringite e traqueíte. Os animais soropositivos tiveram apenas pequenas áreas de rinite necrotizante subaguda fibrinopurulenta.

Hübner et al. (1996) avaliaram 11 bezerras positivas para a presença de Acs para o BoHV-1 em propriedade com baixa prevalência da doença e verificaram baixos títulos de Acs séricos nestas bezerras após a mamada de colostro de 2 a 16, além de diminuição dos teores de ACs até os seis meses de idade. Os bezerros começaram a apresentar resultados negativos na soroneutralização (SN) a partir dos 28 dias de vida, no entanto, alguns animais mantiveram títulos circulantes até seis meses de idade.

Moreira et al. (2001) demonstraram que bezerros nascidos de mães soropositivas e não vacinadas para o BoHV-1 apresentaram títulos séricos de Acs até os três meses de idade; e filhos de vacas soropositivas e imunizadas

apresentaram maiores títulos de Acs. Os autores referiram que o vírus estava circulante durante o período estudado porque animais não reagentes apresentaram soroconversão durante o período experimental. Desta forma, a persistência dos títulos de ACs maternos não pôde ser interpretada com confiabilidade mediante exposição natural ao antígeno.

Gatti et al. (2010) verificaram que bezerras nascidas de mães soronegativas e não imunizadas não apresentaram títulos de Acs circulantes específicos para o BoHV-1 após a ingestão de colostro. Além disso, as filhas de mães soronegativas e vacinadas apresentaram baixos títulos de Acs específicos após a colostragem até os trinta dias de idade; filhas de vacas soropositivas vacinadas ou não imunizadas apresentaram maiores títulos de ACs neutralizantes que os grupos citados anteriormente. Além disso, observaram a persistência de ACs neutralizantes séricos até 120-150 dias de vida nos filhos de mães soropositivas vacinadas ou não.

Donovan et al. (2007) avaliaram os efeitos dos leucócitos colostrais na resposta imunológica de bezerros neonatos para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e *Mycobacterium* spp até 28 dias de vida pós-nascimento. As mães dos neonatos foram vacinadas apenas para o BVDV. Os referidos autores observaram que a ingestão de colostro com células viáveis favoreceu a resposta proliferativa das células mononucleares do sangue dos bezerros neonatos ao BVDV citopático e não citopático. O mesmo fenômeno não foi observado para o *Mycobacterium* spp, portanto, acredita-se que a transferência da resposta imune celular ao neonato depende do contato prévio da mãe com o antígeno. Com exceção deste referido trabalho não foram encontrados outros estudos que avaliaram a imunidade celular de bezerros após a sua imunização passiva.

No levantamento bibliográfico realizado foram encontradas algumas limitações nos estudos realizados no Brasil: as pesquisas brasileiras avaliaram apenas a imunidade humoral dos bezerros especialmente pela titulação de ACs neutralizantes específicos para o BoHV- 1; nenhum destes trabalhos apresentaram resultados a respeito da imunidade celular; pesquisas específicas sobre imunidade passiva ao BVDV foram escassas.

Altas taxas de falha na transferência de imunidade passiva, ao redor de 35% (FEITOSA et al., 2010) e a persistência dos componentes imunológicos do

colostro materno na circulação sanguínea dos bezerros são dependentes da sua qualidade. Desta forma, a hipótese desta pesquisa é que a vacinação materna no período pré-parto pode ser uma estratégia para amplificar a resposta imune celular, além da resposta imune humoral, no sangue de bezerros recém-nascidos aumentando sua proteção para infecções provocadas por agentes virais.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da vacinação materna no período pré-parto sobre a resposta imune humoral e celular de bezerros do nascimento aos seis meses de idade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DA FAZENDA EXPERIMENTAL

A etapa experimental desta pesquisa foi realizada na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) – Gado de Leite, localizada na cidade de Nova Odessa. Esta propriedade não utilizava qualquer esquema de vacinação para BVDV e BoHV-1 e possuía histórico de baixa prevalência para o BVDV ao redor de 13% para o vírus da diarreia viral bovina.

4.2 SELEÇÃO DAS FÊMEAS GESTANTES

As vacas gestantes foram inicialmente selecionadas pela previsão do parto, considerando a data da inseminação artificial e em relação à sua proximidade com o período experimental desta pesquisa. Foram colhidas amostras de sangue provenientes de 36 vacas pela venopunção da jugular, utilizando-se sistema a vácuo em tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro e realização da prova de soroneutralização (SN) para BVDV e BoHV-1. Estas amostras foram congeladas a -70°C e encaminhadas para processamento no “Laboratório de Viroses de Bovídeos” do Instituto Biológico, segundo procedimentos descritos pela Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2008).

Foram selecionadas dez vacas gestantes soronegativas para BVDV e BoHV-1, que foram distribuídas em dois grupos experimentais, vacas não vacinadas (Grupo 1) e vacinadas (Grupo 2) no período pré-parto (Quadro 01).

Quadro 01 – Vacas gestantes, identificação das mães e seus respectivos conceptos de acordo com os grupos experimentais

Grupos Experimentais	Vacas	Bezerros (Fazenda)
Grupo 1 (G1)	1333	1548
	1437	1552
	1406	1560
	1288	1563
Grupo 2 (G2)	1265	1566
	4453	1567
	4456	1568
	1241	1569
	1459	759
	1485	763

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

4.3 IMUNIZAÇÃO DAS VACAS (G2)

As vacas selecionadas inicialmente para composição do Grupo 2 foram imunizadas no período pré-parto com a vacina comercial contendo as estirpes do BVDV tipo 01 (5960) de um isolado em Iowa (EUA), BVDV tipo 2 (53637) inativadas de um isolado de Ontario (EUA) e BoHV-1 (RLB103). A vacinação das mães foi realizada aos 42 e 21 dias do momento do parto previsto pela aplicação subcutânea de 5mL da vacina comercial.

4.4 ACOMPANHAMENTO DAS VACAS

As vacas gestantes foram mantidas em piquete maternidade dos 30 dias que antecederam o parto até o momento da parição e identificadas com o uso de colar para diferenciá-las do restante do rebanho. Para detecção do trabalho de parto, as fêmeas eram avaliadas no período diurno e noturno a cada duas horas, para controlar a ingestão de colostro e colheita de amostras sanguíneas dos bezerros antes da primeira mamada. Os partos foram assistidos e os

recém-nascidos separados de suas mães imediatamente após o nascimento (Figura 01).

Figura 01 – (a/b) Piquete maternidade onde as vacas gestantes permaneceram no pré-parto; (c) Identificação das vacas gestantes; (d/e) bezerro recém-nascido oriundo de parto noturno ocorrido no piquete maternidade - São Paulo - 2013

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

4.5 IMUNIZAÇÃO PASSIVA E MANUTENÇÃO DOS BEZERROS

Após a parição, as vacas foram encaminhadas para a sala de ordenha para obtenção do colostro (Figura 02). Foram administrados seis litros de “pool”

de colostro de 1ª ordenha proveniente de suas respectivas mães por meio de mamadeira e, quando necessário, sondagem oro-gástrica, quantidade dividida em duas alimentações diárias de três litros cada, administradas até 12 horas pós-nascimento (p.n.) (Figura 03). A seguir, os bezerros foram alimentados com seis litros 6L de sucedâneo lácteo[1], ração comercial[2], feno, sal mineral e água "*ad libitum*" até o desmame de forma a acelerar o desenvolvimento dos pré-estômagos. Aos 60 dias de vida iniciou-se o desmame gradual. Posteriormente, a quantidade de ração comercial dos bezerros foi gradualmente aumentada para três quilos 3kg.

Os animais foram mantidos em baias até os 15 dias de vida e posteriormente foram transferidos da APTA para a Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) para evitar exposição natural ao BVDV e BoHV-1 (Figura 04).

Figura 02 – a/b – Ordenha das vacas no pós-parto imediato para obtenção de colostro - São Paulo - 2013

(a) (b)

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

[1] Lacthor®, Tortuga
[2] Ração para bezerros®, Agromix

Figura 03 – a/b – Fornecimento de colostro aos bezerros recém-nascidos com uso de mamadeira e sondagem oro-gástrica - São Paulo - 2013

(a)

(b)

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

Figura 04 – (a) Vista externa; (b) Vista interna das baias onde os bezerros ficaram alojados dos 15 dias p.n aos seis meses de idade - São Paulo - 2013

(a)

(b)

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

4.6 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os bezerros foram distribuídos em dois grupos experimentais, conforme imunização materna ao vírus da BVDV e BoHV-1 no período pré-parto (Quadros 02 e 03).

Quadro 02 – Constituição dos grupos experimentais

Grupos experimentais (G)	**G1**	**G2**
Recebimento colostro	X	X
Vacinação materna		X

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Quadro 03 – Distribuição das vacas e bezerros de acordo com dos grupos experimentais G1 e G2

Grupos Experimentais	**Identificação Animais**			**Data Parição**
	Vacas	**Bezerros** (Experimento)	**Bezerros** (Fazenda)	
Grupo 1	1333	1	1548	16/06/2012
	1437	2	1552	18/06/2012
	1406	3	1560	24/06/2012
	1288	4	1563	27/06/2012
Grupo 2	1265	5	1566	12/07/2012
	4453	6	1567	12/07/2012
	4456	7	1568	19/07/2012
	1241	8	1569	22/07/2012
	1459	9	759	26/09/2012
	1485	10	763	08/10/2012

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

4.7 COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue dos bezerros (n=10) foram obtidas antes do fornecimento de colostro (T0), a cada dois dias após o fornecimento do colostro (T1 a T5), aos quinze (T6) e trinta (T7) dias de vida, seguidas de colheitas mensais até os 180 dias pós-nascimento (T12), conforme ilustrado no Quadro 04. As amostras foram colhidas em tubos com EDTA e sem anticoagulante. Os tubos com EDTA foram utilizados para realização dos leucogramas e

imunofenotipagem dos linfócitos sanguíneos; os tubos sem anticoagulante foram usados para obter soro para a titulação de anticorpos específicos para o BVDV e BoHV-1.

Quadro 04 - Momentos padronizados para colheitas das amostras de sangue e soro no período pós-natal de bezerros neonatos

Momentos das colheitas	
Tempo Zero (T0)	Antes da ingestão do colostro
T1	1-2 dias
T2	3-4 dias
T3	5-6 dias
T4	7-8 dias
T5	9-10 dias
T6	15 dias
T7	30 dias
T8	60 dias
T9	90 dias
T10	120 dias
T11	150 dias
T12	180 dias

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

4.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.8.1 Leucograma dos bezerros

O número total de leucócitos sanguíneos foi obtido por meio da contagem automática[3] e a contagem diferencial realizada por meio da avaliação dos esfregaços sanguíneos e diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico com aumento de 400 X. (BIRGEL; BENESI, 1982).

4.8.2 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos

As subpopulações dos leucócitos sanguíneos foram determinadas

[3] ABC Vet® - ABX™

utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para receptores de superfície celular, associados com marcadores de diferenciação e ativação, pela técnica de citometria de fluxo, conforme painel de anticorpos selecionados (Quadro 5).

Foram transferidos 100µL de sangue total obtido em tubos com EDTA, para tubos de citometria de fluxo. A lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 900µL de solução comercial[4], que permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada à 282 G por 8 minutos; o sobrenadante foi desprezado e os leucócitos sanguíneos ressuspendidos em 1 mL de PBS, a mistura foi novamente centrifugada para lavagem das células. Por fim, acrescentou-se 1 mL de PBS ao "pellet" de leucócitos.

Para a marcação das células foi adicionado 1µg dos anticorpos monoclonais primários nas suspensões celulares, mantidas sobre gelo triturado por 30 minutos, e novamente lavadas em solução de PBS. Em seguida, foram adicionados anticorpos monoclonais secundários, utilizando-se fluorocromos[5], 1µg de FITC (*Fluorescente Isothiocyanate*) e PE (*Phycoerythrin*) e 10 µg de PERCP (*Peridinin-Chlorophyll Proteins*), conforme ilustrado no Quadro 06. Após 30 minutos sobre gelo, em ambiente escuro, as amostras foram novamente submetidas à lavagem e ressuspendidas com solução de PBS (1mL) e reservadas para avaliação das fluorescências emitidas nos comprimentos de onda 488-525 (FITC), 488-575 (PE) e 488-675 (PERCP) em citômetro de fluxo[6]. Os ensaios realizados estão discriminados no Quadro 07.

Foram adquiridos cinqüenta mil eventos utilizando-se o programa CellQuest Pro®[7] e que foram avaliados quanto à sua fluorescência emitida pelos anticorpos secundários utilizando-se o programa FlowJo®, versão 7.2.5. Nesta etapa, foi possível selecionar a população de células mononucleares pelo seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 5). Inicialmente verificou-se a expressão do marcador $CD3^+$ dentre a população selecionada para a seguir identificar suas subpopulaçoes $CD8^+$, $CD4^+$ e gama-delta ($WC1^+$). A expressão do marcador $CD21^+$ (linfócitos B) também foi verificada dentre os

---

[4] Facslysing, Becton Dickinson Immunocytometry System®
[5] Invitrogen® e Becton Dickinson Immunocytometry System®
[6] FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA)
[7] Becton Dickinson Immunocytometry System®

linfócitos previamente selecionados. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (%) de células marcadas.

Quadro 05 – Anticorpos monoclonais primários usados nas marcações e determinações nas subpopulações de linfócitos T (αβ TCR e γδ TCR) e população de linfócitos B

Anticorpo	Isótipo	Especificidade	Clone	Fonte
Mouse anti-bovine CD3	IgG1	Linfócito T αβTCR.	MM1A	VMRD, Pullman,EUA
Mouse anti-bovine CD4	IgG2a	Linfócito T αβTCR.	IL-A11	VMRD, Pullman,EUA
Mouse anti-bovine CD8	IgM	Linfócito T αβTCR.	BAQ111A	VMRD, Pullman,EUA
Mouse anti-bovine WC1-N1	IgM	Linfócito Tγδ TCR	B7A1	VMRD, Pullman,EUA
Mouse anti-bovine B-lymphocytes	IgM	Linfócito B	BAQ15A	VMRD, Pullman,EUA

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Quadro 06- Anticorpos secundários usados nas análises de citometria de fluxo

Anticorpo Secundário	Isotipo	Referência	Fonte
Goat anti-mouse	IgM	M31501	Invitrogen®, EUA
Goat anti-mouse	IgG2a	M32204	Invitrogen®, EUA
Rat anti-mouse	IgG1	Cat. 340272	Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA

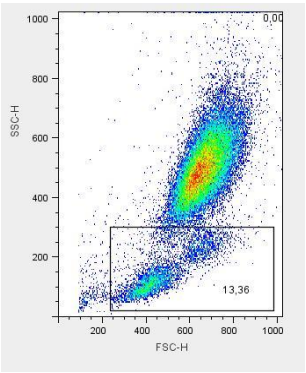
Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Quadro 07 – Ensaios realizados para a determinação das subpopulações e da ativação dos linfócitos sanguíneos

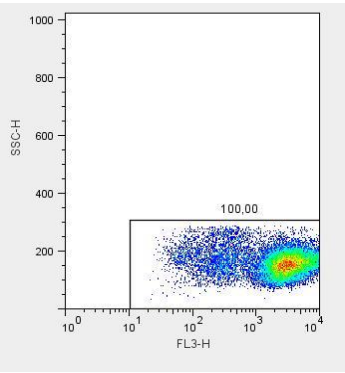
Branco		Somente Células
Compensações Fluorescências	FITC	Células + WC1-FITC
	PE	Células + CD4-PE
	PERCP	Células +CD3-PERCP
Ensaios	Ensaio A: Linfócitos Tαβ	Células CD3-PERCP CD4-PE CD8-FITC
	Ensaio B: Linfócitos Tγδ	Células CD3-PERCP WC1-FITC
	Ensaio C: Linfócitos B	Células CD21 + FITC

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

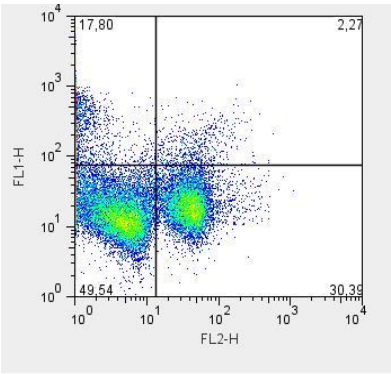
Figura 05- (a) Distribuição das populações de leucócitos sanguíneos de acordo com sua granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) e seleção da população de leucócitos mononucleares; (b) População de linfócitos T sanguíneos identificados pela seleção marcador CD3⁺ (FL3); (c) Subpopulações de linfócitos T sanguíneos citotóxicos CD8⁺ (FL1) e auxiliares CD4⁺ (FL2); (d) Histograma da população de linfócitos T gama-delta expressando o marcador WC1⁺ (FL-1); (e) Histograma da população de linfócitos B expressando o marcador CD21⁺ (FL-1) - São Paulo - 2013



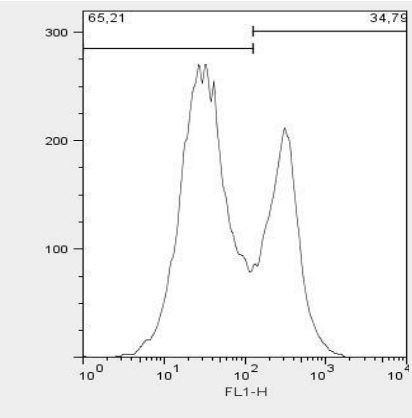
(a)



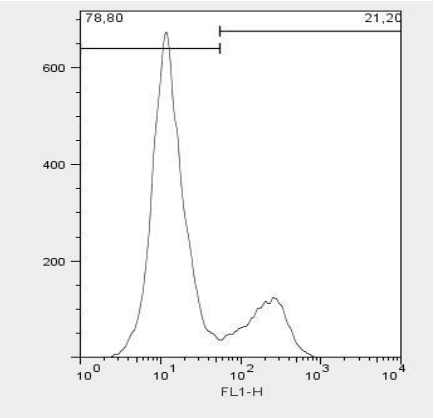
(b)



(c)



(d)



(e)

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

4.8.3 Titulação de anticorpos específicos para o BVDV e BoHV-1

a) Obtenção do soro

O soro sanguíneo dos bezerros foi obtido a partir de sangue colhido em tubos sem anticoagulante, centrifugados a 1.223 G por 10 minutos. Após a retração do coágulo, o soro foi retirado e acondicionado em microtubos.

b) Soroneutralização (SN)

A técnica de SN foi realizada de acordo com as recomendações da Organização Internacional de Epizootias (2008) no Laboratório de Viroses de Bovinos – Instituto Biológico. O sangue dos bezerros colhidos em tubos sem anticoagulante foi usado para a obtenção do soro sanguíneo usado no teste de soroneutralização (SN) e a detecção de anticorpos neutralizantes para o BVDV foi feita após prévia inativação das amostras a 56°C por 30 minutos. Foram usadas placas de poliestireno com 96 cavidades, utilizando uma diluição constante do soro, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:5 até 1:5120, tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM. Feita a diluição das amostras, foi adicionado à placa 50 µL da solução “estoque” contendo 100 $TCID_{50}$ da cepa citopatogênica NADL do BVDV. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO2. Após este período, as placas receberam 50µL de suspensão de células MDBK na concentração de 3 x 10^5 células/mL, em cada cavidade. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO2 durante 4 a 5 dias.

Para detecção de anticorpos neutralizantes para o BoHV, a diluição também foi feita na base logarítmica 2, mas a partir da diluição 1:2 até 1:1024, utilizando-se meio MEM com 1% de antibióticos. Adicionou-se a quantidade de 50µL de 200 TCID50 da cepa Hbv-1 do BoHV-1 nas placas, que foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO2. Transcorrido o período, as placas receberam em cada cavidade 100 µL de suspensão de MDBK na concentração de 0,3 x 10^6 células/mL.

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 conseqüentemente 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).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Os grupos de bezerros foram distribuídos em dois grupos compostos por bezerros que receberam colostro de mães não-imunizadas (Grupo 1) e imunizadas (Grupo 2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1. Para avaliar a influência dos componentes maternos na imunidade dos bezerros, foi realizada a comparação dos resultados obtidos antes (T0) e após (T1) a mamada de colostro; entre os momentos T1 (altos teores de Acs circulantes) e T8 (baixos teores de Acs circulantes); e entre T8 e T12 (ausência de Acs maternos). Sendo estes, portanto, os tempos considerados biologicamente importantes para esta análise.

Primeiramente, todas as variáveis em todos os tempos foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Com este teste, constatou-se que houve variáveis com distribuição normal e outras não, então optou-se por testes não paramétricos em todas as análises. Além disso, o baixo número de animais em cada grupo favoreceu o poder estatístico dos testes não paramétricos em todas as análises.

Os resultados dos títulos do BVDV foram transformados em variáveis qualitativas pela presença e ausência de títulos de Acs neutralizantes, uma vez que houve várias amostras negativas submetidas à SN. Desta forma, os testes com títulos de anticorpos neutralizantes abaixo e acima de 10 para o BVDV foram considerados negativos e positivos, respectivamente. Para comparar os

grupos, foi realizado o teste de qui-quadrado em cada um dos tempos estudados.

Para o BoHV-1, obtiveram-se títulos positivos no grupo de bezerros que ingeriram colostro de mães vacinadas (G2), optando-se pela análise qualitativa e quantitativa dos resultados. Os títulos de anticorpos específicos ao BoHV-1 obtidos na SN (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024) e em seguida, foram calculadas as médias aritméticas dos grupos 01 e 02 em cada momento estudado. Posteriormente, as médias dos logaritmos de base 2 foram transformados em títulos médios geométricos (GMT) pela relação: $GMT = 2^{a}$, onde “a” é a média aritmética do log do título de anticorpos (THRUSFIELD, 2004). Uma vez transformados em logaritmos na base 2, a diferença entre os grupos foi testada com o teste U de Mann Withney.

Os valores relativos e absolutos dos tipos leucocitários e das subpopulações de linfócitos obtidos na imunofenotipagem entre os grupos foram avaliados com o Teste U de Mann-Whitney e entre os tempos pelo teste de Friedmann. A este último teste, quando apresentou, pelo menos um tempo significativamente diferente, foram realizadas as comparações múltiplas por meio do teste de Wilcoxom.

Todos os testes foram considerados significativos quando $P<0,05$.

6 RESULTADOS

A pesquisa em questão foi delineada para avaliar a influência da vacinação materna no período pré-parto na resposta imune humoral e celular de bezerros do nascimento aos seis meses de idade.

Durante o longo período deste estudo, alguns dos animais usados nesta pesquisa apresentaram enfermidades clássicas dos sistemas de criação de bezerros (Quadro 08), inclusive o bezerro 05 do G2 foi excluído desta pesquisa a partir do T6 pois apresentava onfaloarterite e foi encaminhado para cirurgia.

A apresentação dos resultados foi realizada considerando-se a resposta imune humoral e celular após a mamada de colostro.

Quadro 08 – Bezerros que apresentaram enfermidades nos momentos experimentais

Grupos	Bez.	T1	T2	T4	T5	T6	T11-T12
G1	01	Hígido				Onfalite	Hígido
	02	Hígido				Timpanismo Gasoso	Hígido
	03	Onfalite Diarreia	Onfalite Diarreia	Diarreia	Diarreia	Onfalite	Inflamação
G2	05	Onfalite	Onfalite	Onfalite		Onfalite	Hígido
	06	Hígido				Diarreia	Hígido
	07	Hígido				Onfalite Diarreia	Hígido
	08	Hígido				Diarreia	Hígido

Fonte: Baccili, C. C. (2013).
Legenda: Bez. Bezerros.

6.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

a) Proporção da População de Linfócitos B ($CD21^+$)

Os valores medianos relativos e absolutos da população de linfócitos B ($CD21^+$) estão dispostos na tabela 01 e figura 06.

Apesar de não ser objetivo desta pesquisa observou-se aumento gradativo das células $CD21^+$ do nascimento aos seis meses de vida, observando-se variações de 11 a 26% do T0 ao T12 no G1 e 15 a 28% no G2. No entanto, não foram verificadas grandes diferenças entre os grupos

experimentais, com exceção dos maiores valores medianos absolutos de $CD21^+$ no G2 no momento T0 (P=0,02).

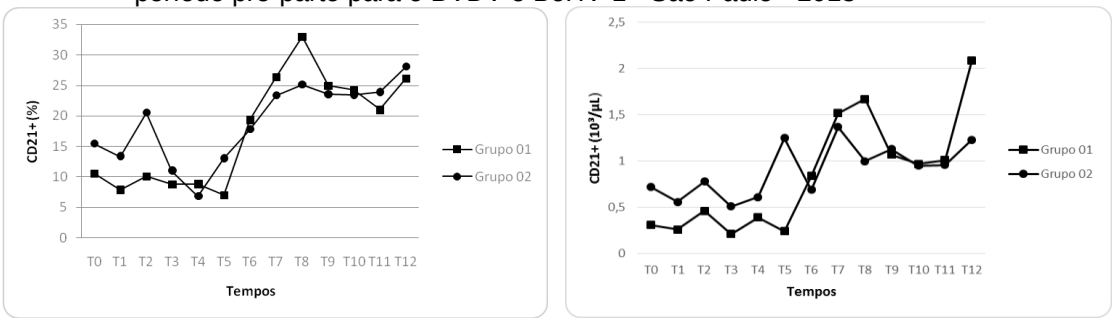
Não foram observadas diferenças nos valores absolutos e relativos de $CD21^+$ antes (T0) e após (T1) da mamada de colostro; entre os tempos T1 (1 a 2 dias de vida) e T8 (60 dias de idade); T8 e T12 (180 dias de vida) (P>0,05) nos grupos 01 e 02.

Tabela 01 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos ($x10^3/\mu L$) dos linfócitos B (CD21+) presentes no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para BVDV e BoHV-1, do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)

Tempos	**$CD21^+$**			
	Grupo 1		**Grupo 2**	
	%	Abs	%	Abs
T0	11	$0,31^B$	15	$0,72^A$
T1	8	0,26	13	0,56
T2	10	0,46	21	0,78
T3	9	0,21	11	0,51
T4	9	0,39	7	0,61
T5	7	0,24	13	1,25
T6	19	0,84	18	0,69
T7	26	1,52	23	1,37
T8	33	1,67	25	1,00
T9	25	1,07	24	1,13
T10	24	0,97	23	0,95
T11	21	1,01	24	0,96
T12	26	2,09	28	1,23

Fonte: Baccili, C. C. (2013)
Letras A e B maiúsculas na mesma linha para cada parâmetro indicam diferença estatística entre si.
Abs: absoluto; % porcentagem; T: tempo.

Figura 6 – Medianas dos valores relativos e absolutos dos linfócitos B ($CD21^+$) no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013)

b) ACs específicos ao BVDV e BoHV-1

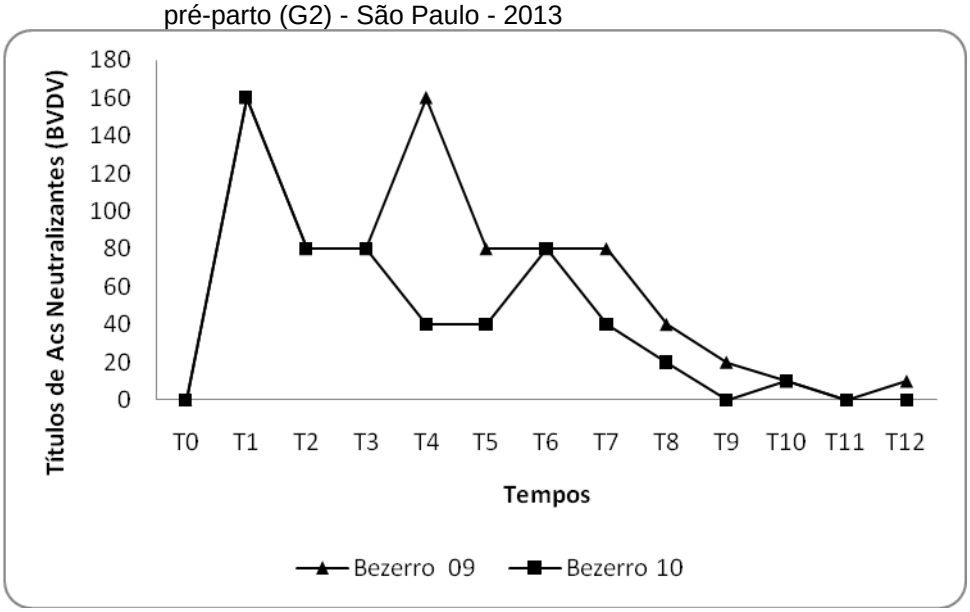
Não foram observados ACs neutralizantes para o BVDV e BoHV-1 no soro sanguíneo dos bezerros em nenhum dos grupos antes da mamada do colostro (T0). Após a mamada de colostro (T1), os bezerros do grupo 01 permaneceram negativos até o T12 para o BVDV (Tabela 02) e BoHV-1 (Tabela 03).

Tabela 02 - Títulos médios de Acs neutralizantes para o BVDV no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto

Grupos	Bezerros	Tempos												
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
G1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	5	0	0	0	0	0	0	0	Excluído					
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0		0
	9	0	160	80	80	160	80	80	80	40	20	10	0	10
	10	0	160	80	80	40	40	80	40	20	0	10	0	0

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 07- Títulos de Acs neutralizantes para o BVDV obtidos nos animais soropositivos após a mamada de colostro de mães imunizadas no pré-parto (G2) - São Paulo - 2013



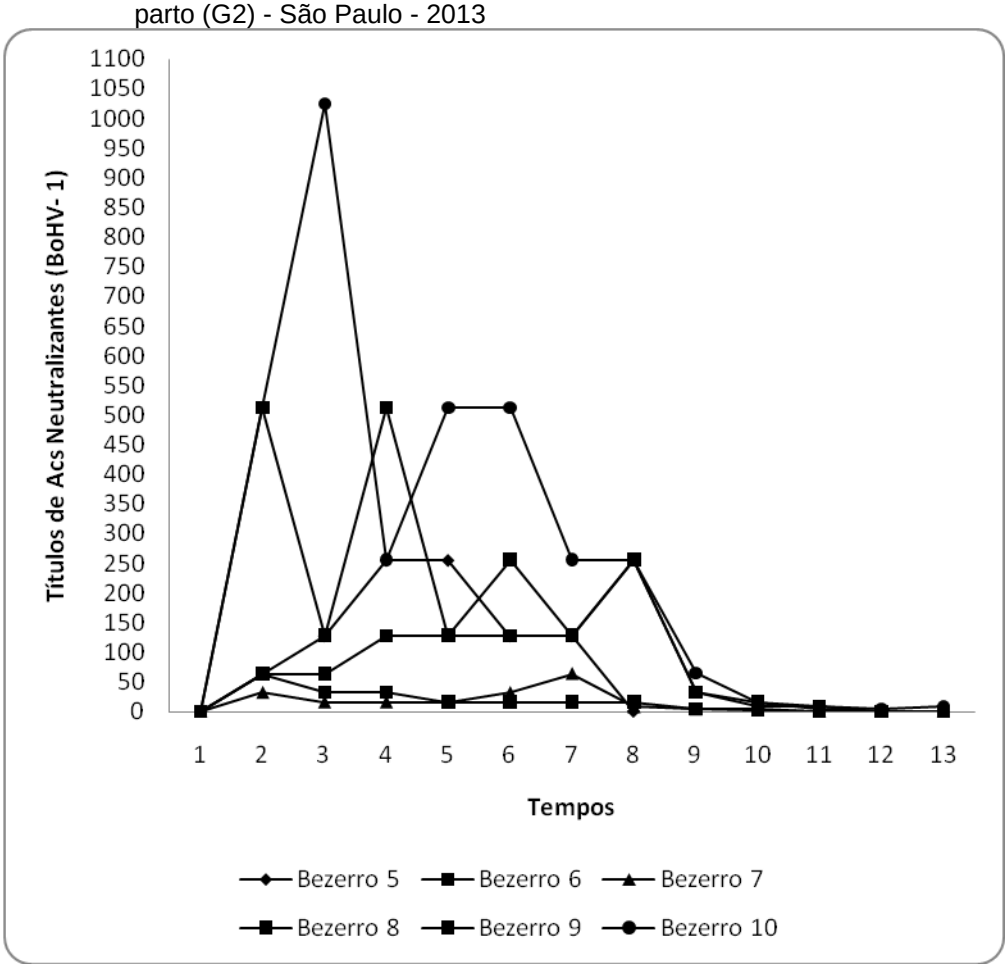
Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Tabela 03- Títulos médios de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto

Grupos	Bezerros	Tempos												
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
G1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	5	0	64	128	256	256	128	128	0	Excluído				
	6	0	64	64	128	128	128	128	256	32	8	8	0	0
	7	0	32	16	16	16	32	64	8	4	4	0	0	0
	8	0	512	128	512	128	256	128	256	32	16	4	0	0
	9	0	64	32	32	16	16	16	16	4	2	0	0	0
	10	0	512	1024	256	512	512	256	256	64	16	8	4	8

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 08- Títulos de Acs neutralizantes para o BoHV- 1 obtidos nos animais soropositivos após a mamada de colostro de mães imunizadas no pré-parto (G2) - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

No grupo de bezerros que ingeriram colostro de vacas vacinadas (G2) observou-se soroconversão 33% (2/6) para BVDV e 100% (6/6) para BoHV-1, tabelas 02 e 03, e figuras 07 e 08. A frequência de animais soropositivos e soronegativos aos agentes virais do T0 ao T12 estão dispostos na tabela 04, e os agentes virais BVDV E BoHV-1 do G2, respectivamente nas figuras 09 e 10.

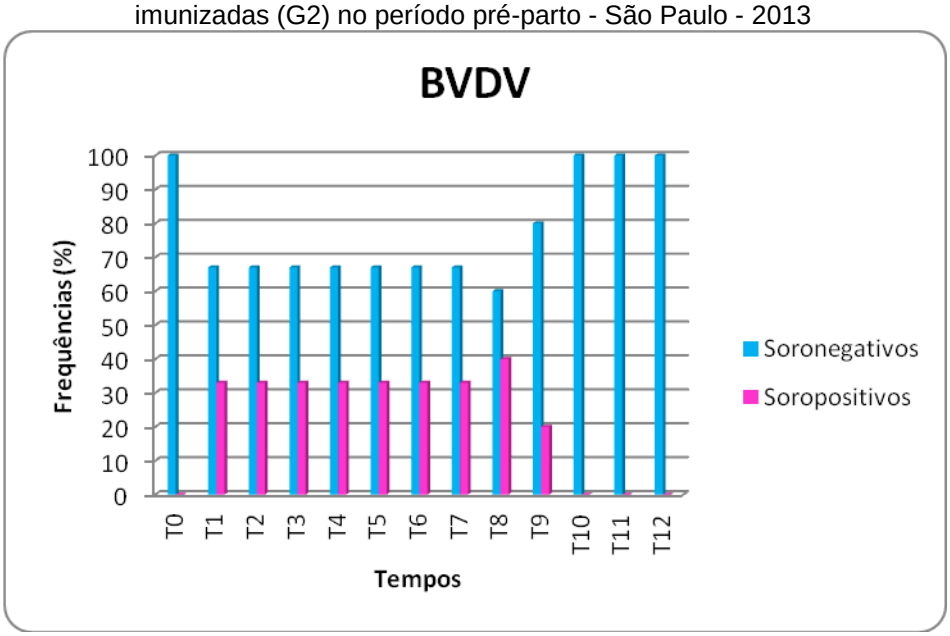
Foram observadas diferenças entre as frequências de animais soropositivos e soronegativos entre os grupos de bezerros G1 e G2 para o BoHV-1 obtidas pelo Teste do Qui-quadrado, nos momentos T1 até T10 (Tabela 04). Para o BVDV não foram encontradas diferenças entre G1 e G2 em todo o período estudado (P>0,05).

Tabela 04- Frequências de animais soropositivos e soronegativos ao BVDV e BoHV-1, que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto

Tempos	Res.	BVDV					BoHV-1				
		Grupo 1		Grupo 2		Significância	Grupo 1		Grupo 2		Significância
		N	%	N	%		N	%	N	%	
T0	(+)	0	0	0	0	NA*	0	0	0	0	NA*
	(-)	4	100	6	100		4	100	6	100	
T1	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	6	100	0,005
	(-)	4	100	4	67		4	100	0	0	
T2	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	6	100	0,005
	(-)	4	100	4	67		4	100	0	0	
T3	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	6	100	0,005
	(-)	4	100	4	67		4	100	0	0	
T4	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	6	100	0,005
	(-)	4	100	4	67		4	100	0	0	
T5	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	6	100	0,005
	(-)	4	100	4	67		4	100	0	0	
T6	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	6	100	0,005
	(-)	4	100	4	67		4	100	0	0	
T7	(+)	0	0	2	33	0,197	0	0	5	83	0,048
	(-)	4	100	4	67		4	100	1	17	
T8	(+)	0	0	2	40	0,240	0	0	5	100	0,007
	(-)	4	100	3	60		4	100	0	0	
T9	(+)	0	0	1	20	0,435	0	0	4	80	0,036
	(-)	4	100	4	80		4	100	1	20	
T10	(+)	0	0	0	0	NA*	0	0	3	60	0,054
	(-)	4	100	5	100		4	100	2	40	
T11	(+)	0	0	0	0	NA*	0	0	1	20	0,306
	(-)	4	100	5	100		4	100	4	80	
T12	(+)	0	0	0	0	NA*	0	0	1	20	0,306
	(-)	4	100	5	100		4	100	4	80	

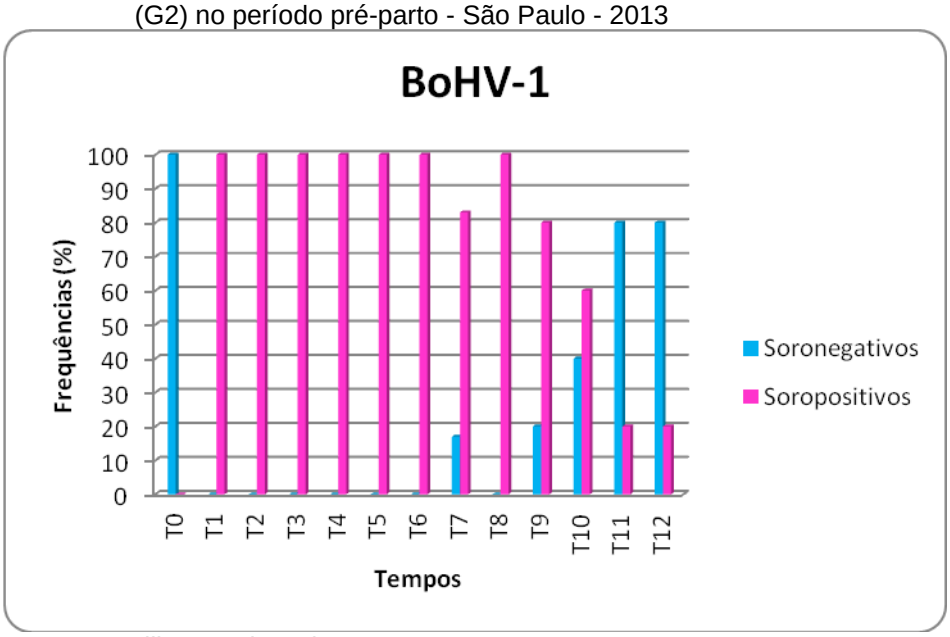
Fonte: Baccili, C. C. (2013).
Legenda: *NA: resultados obtidos constantes entre os grupos no qual todos os animais foram classificados como soronegativos,Res: Resultados, (+) Positivo,(-) Negativo.

Figura 09- Frequências de animais soropositivos e soronegativos ao BVDV, que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 10 - Frequências de animais soropositivos e soronegativos ao BoHV-1, que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Os títulos médios geométricos (GMT) obtidos para o BoHV-1 no G2 aumentaram de 0 para 113,8 do T0 para o T1 (P= 0,01), em seguida variaram e diminuíram nos tempos subsequentes até alcançar o valor mínimo de 1,51 no

T12. Foi possível identificar diferença entre os grupos 01 e 02 do T1 ao T10 (P=0,08) (tabela 05 e figura 11).

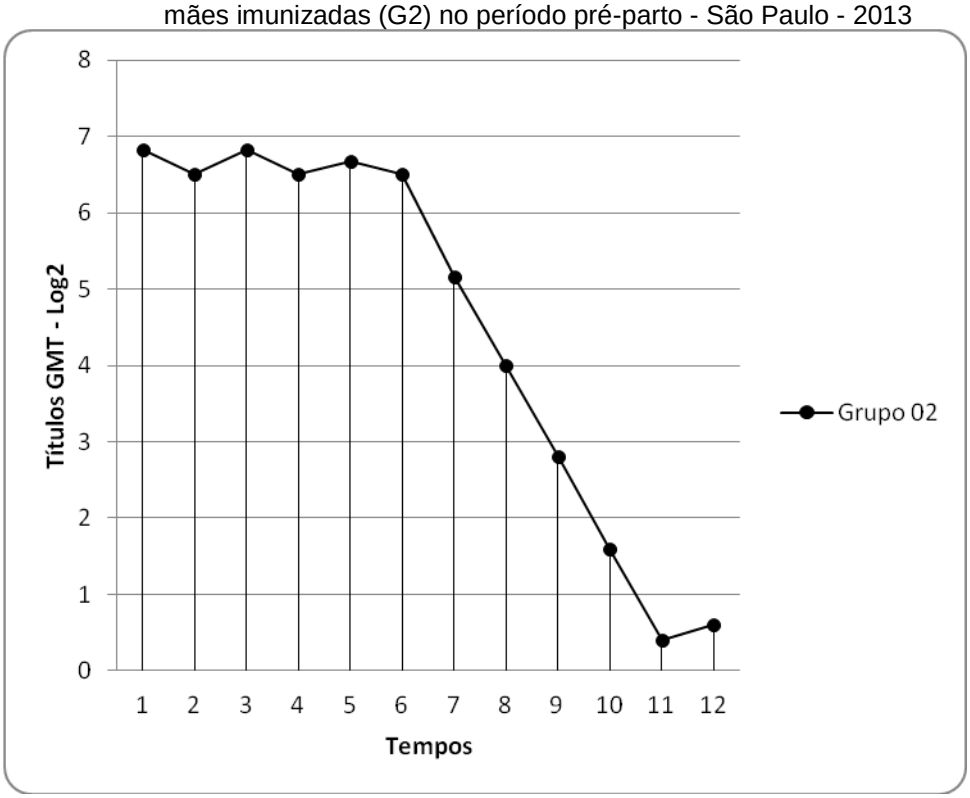
Na avaliação quantitativa para BoHV-1 não se constou diferença significativa entre os tempos do grupo 1, porém no grupo 2 (P=0,02) houve diferenças entre todos os tempos estudados T0 e T1 (P=0,026), T1 e T8 (P=0,041) e T8 e T12 (P=0,041).

Tabela 05 - Títulos médios geométricos (GMTs) de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto

Tempos	**Grupo 1**	**Grupo 2**		**Significâncias**
	log2 GMT	**log2 GMT**	**GMT**	
T1	0	6,83	113,77	0,01
T2	0	6,50	90,50	0,01
T3	0	6,83	113,77	0,01
T4	0	6,50	90,50	0,01
T5	0	6,67	101,82	0,01
T6	0	6,50	90,50	0,01
T7	0	5,17	36,00	0,02
T8	0	4,00	16,00	0,01
T9	0	2,80	6,96	0,01
T10	0	1,60	3,03	0,08
T11	0	0,40	1,31	0,37
T12	0	0,60	1,51	0,37

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 11 - Títulos médios geométricos (GMT) – log2 de Acs neutralizantes para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães imunizadas (G2) no período pré-parto - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013)

6.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

6.2.1 Leucograma

As medianas dos valores absolutos de leucócitos (Le) totais estão dispostos na tabela 06 e figura 12. Os valores de Le totais foram superiores numericamente no grupo G2 do nascimento aos 30 dias de vida (T7); no entanto, não se detectou diferença estatística (P>0,05). A partir deste momento, foi notaram-se oscilações com maiores valores no G1 e com diferença estatística nos tempos T8 (P=0,05), T10 (P=0,05) e T12 (P=0,02).

As medianas dos valores relativos (%) e absolutos dos leucócitos mononucleares (MN) também estão dispostas na tabela 06 e figura 12. Os valores de linfócitos não sofreram grandes oscilações entre os grupos experimentais, com exceção da maior mediana observada no T12 no grupo de bezerros G1 que ingeriram colostro de mães não-vacinadas (P=0,05).

Consideradas as variações nos G1 e G2 nos primeiros dias de vida foi possível observar aumento considerável no número de linfócitos do nascimento (T0) ao T7 (30 dias de vida), quando os valores relativos e absolutos foram próximos ao minimo (G1) ou máximo (G2)

Os monócitos oscilaram muito entre os grupos, encontrando-se maiores valores absolutos nos tempos T10 (P=0,01) e T12 (P=0,05); e os valores relativos foram maiores em G1 no T6 (P=0,03), T7 (P=0,02) e T11 (P=0,01), com exceção do T9 (P=0,01) no qual foi observada maior mediana no G2.

Tabela 06 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos ($x10^3/\mu L$) dos leucócitos totais e mononucleares do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)

Tempos	**Grupo 1 (G1)**					**Grupo 2 (G2)**				
	Le	**Linf**		**Mon**		**Le**	**Linf**		**Mon**	
	Abs	%	Abs	%	Abs	Abs	%	Abs	%	Abs
T0	14,00.	20	2,30	9	1,19	14,35	30	3,89	12	1,67
T1	14,55	20	3,49	5	0,87	13,05	36	3,78	10	0,91
T2	9,50	39	3,50	17	1,54	10,25	48	4,31	14	1,38
T3	8,35	51	3,56	16	1,40	10,45	58	5,73	11	1,04
T4	10,60	45	4,53	18	1,77	11,85	47	5,82	10	1,27
T5	11,00	39	3,95	12	1,65	11,65	44	5,07	12	1,30
T6	7,85	51	4,45	19^A	1,47	10,50	40	4,62	11^B	1,61
T7	11,05	54	5,67	18^A	2,11	11,80	56	6,77	12^B	1,29
T8	$12,15^A$	43	5,24	13	1,73	$10,50^B$	43	4,38	17	1,78
T9	13,80	41	4,26	11^B	1,50	10,70	54	4,78	16^A	1,56
T10	$12,15^A$	40	4,53	15	$1,52^A$	$7,70^B$	48	4,08	9	$0,69^B$
T11	10,25	51	4,81	14^A	1,33	8,50	46	4,27	9^B	0,83
T12	$11,20^A$	52	$5,86^A$	11	$1,40^A$	$7,30^B$	53	$4,17^B$	9	$0,68^B$

Fonte: Baccili, C. C. (2013)
Legenda: Letras A e B maiúsculas na mesma linha para cada parâmetro indicam diferença estatística entre si na comparações entre grupos.
Le: leucócitos totais; Linf: linfócitos; Mon: monócitos; Abs: absoluto; % porcentagem; T: tempo.

As medianas dos valores relativos e absolutos dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) estão dispostos na tabela 07 e figura 13. Apesar de não ser objetivo desta pesquisa, pode-se observar em linhas gerais observar no número de neutrófilos com o avançar da idade e aumento no número de eosinófilos, porém, poucas diferenças entre os grupos foram observadas.

Os bezerros do G1 apresentaram maiores valores absolutos medianos de neutrófilos (Ne) segmentados no T9 (P=0,05); e para os eosinófilos foram observadas diferenças nos valores absolutos e relativos nos tempos T4 e T9 (P>0,05), também com maiores nos valores em G1.

Não foram observadas diferenças nos valores absolutos de Le totais, neutrófilos segmentados, monócitos, linfócitos e eosinófilos antes (T0) e após (T1) a mamada de colostro; entre os momentos T1 (1 a 2 dias de vida) e T8 (60 dias de idade); T8 e T12 (180 dias de vida) (P>0,05) em cada um dos grupos estudados. O teste de Friedman detectou diferença estatística entre os tempos avaliados apenas para os bastonetes no G1 (P=0,019) e G2 (0,043) com oscilações entre os valores obtidos no T1 e T8 (Tabela 07).

Foram observadas diferenças entre os valores relativos (%) para linfócitos (P=0,021) e eosinófilos (P=0,018) no G2 entre os momentos T1 e T8 com significâncias P=0,043 e P=0,019, respectivamente. Neste mesmo momento observou-se tendência na diferença entre os valores relativos destas células no grupo 01, no qual foram encontrados valores de P=0,051 e P=0,052, respectivamente, para linfócitos e eosinófilos (Tabela 07).

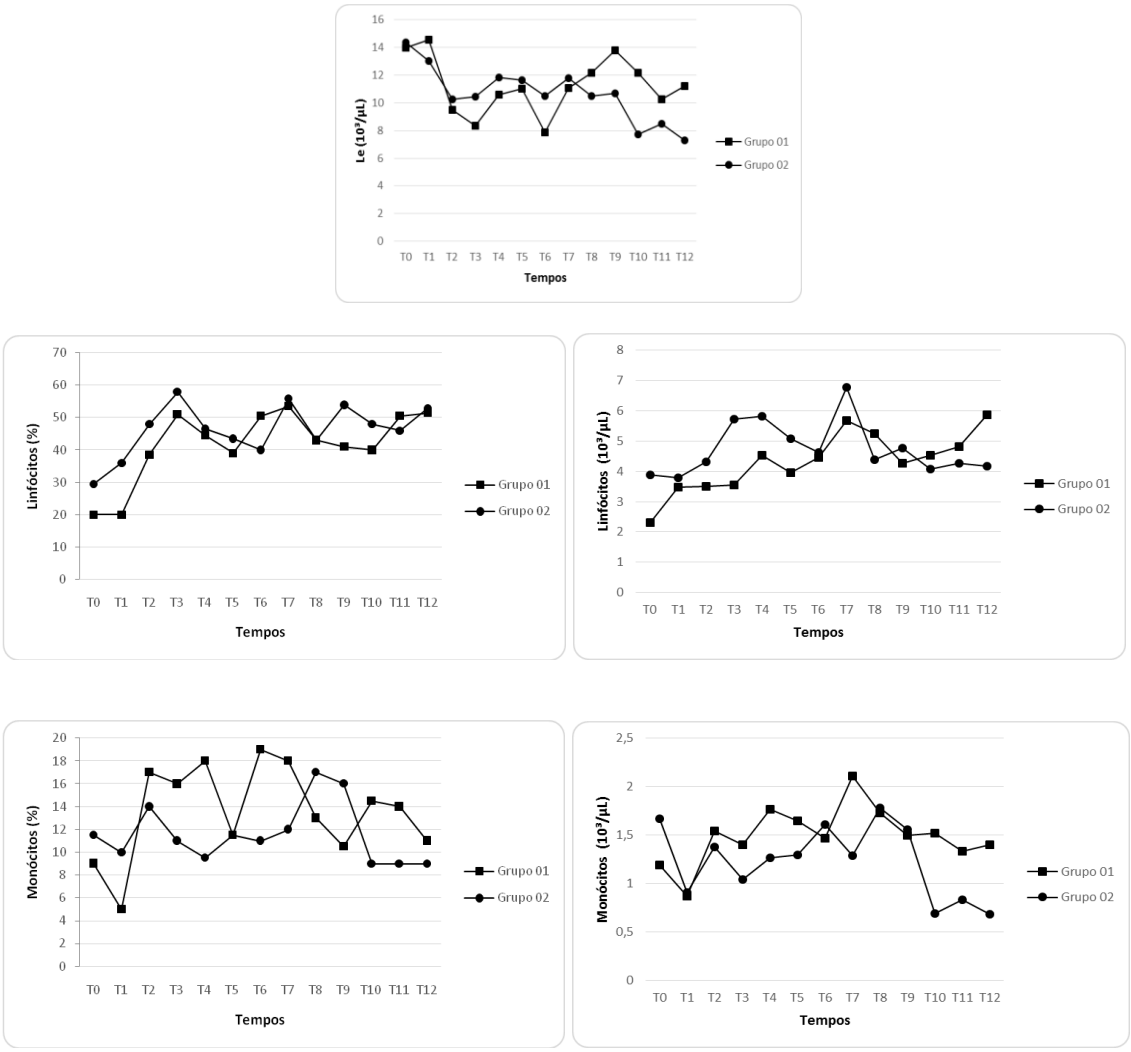
Para os valores relativos de neutrófilos bastonetes foram observadas diferenças em ambos os grupos entre os tempos T0 e T1 no G2 (P=0,039) e entre T1 e T8 em ambos os grupos com significâncias igual a P=0,012 e P=0,039 para o G1 e G2 (Tabela 07).

Tabela 07 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos neutrófilos bastonetes, segmentados e eosinófilos do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)

Tempos	**Grupo 01**						**Grupo 02**					
	Bast		**Seg**		**Eos**		**Bast**		**Seg**		**Eos**	
	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs
T0	2	0,29	70	8,88	0	0	2	0,21	58	8,99	0	0
T1	3	0,44	71	10,34	0	0	4	0,43	44	6,14	0	0
T2	1	0,99	43	3,91	0	0	2	0,17	32	2,72	0	0
T3	1	0,10	32	2,49	0	0	0	0	31	2,94	0	0
T4	0	0	40	4,16	1^A	$0,11^A$	0	0	41	4,56	0^B	0^B
T5	1	0,03	45	4,95	1	0,03	0	0	45	5,56	1	0,04
T6	0	0	29	2,26	2	0,16	0	0	45	5,17	0	0
T7	0	0	29	3,11	1	0,06	0	0	15	1,53	0	0
T8	0	0	39	5,17	3	0,39	0	0	38	4,06	1	0,10
T9	0	0	45	$5,93^A$	3^A	$0,25^A$	0	0	26	$2,26^B$	1^B	$0,07^B$
T10	0	0	42	5,70	1	0,05	0	0	37	2,84	1	0,07
T11	0	0	33	3,54	3	0,21	0	0	28	2,01	1	0,11
T12	0	0	33	3,47	3	0,26	0	0	21	1,53	2	0,15

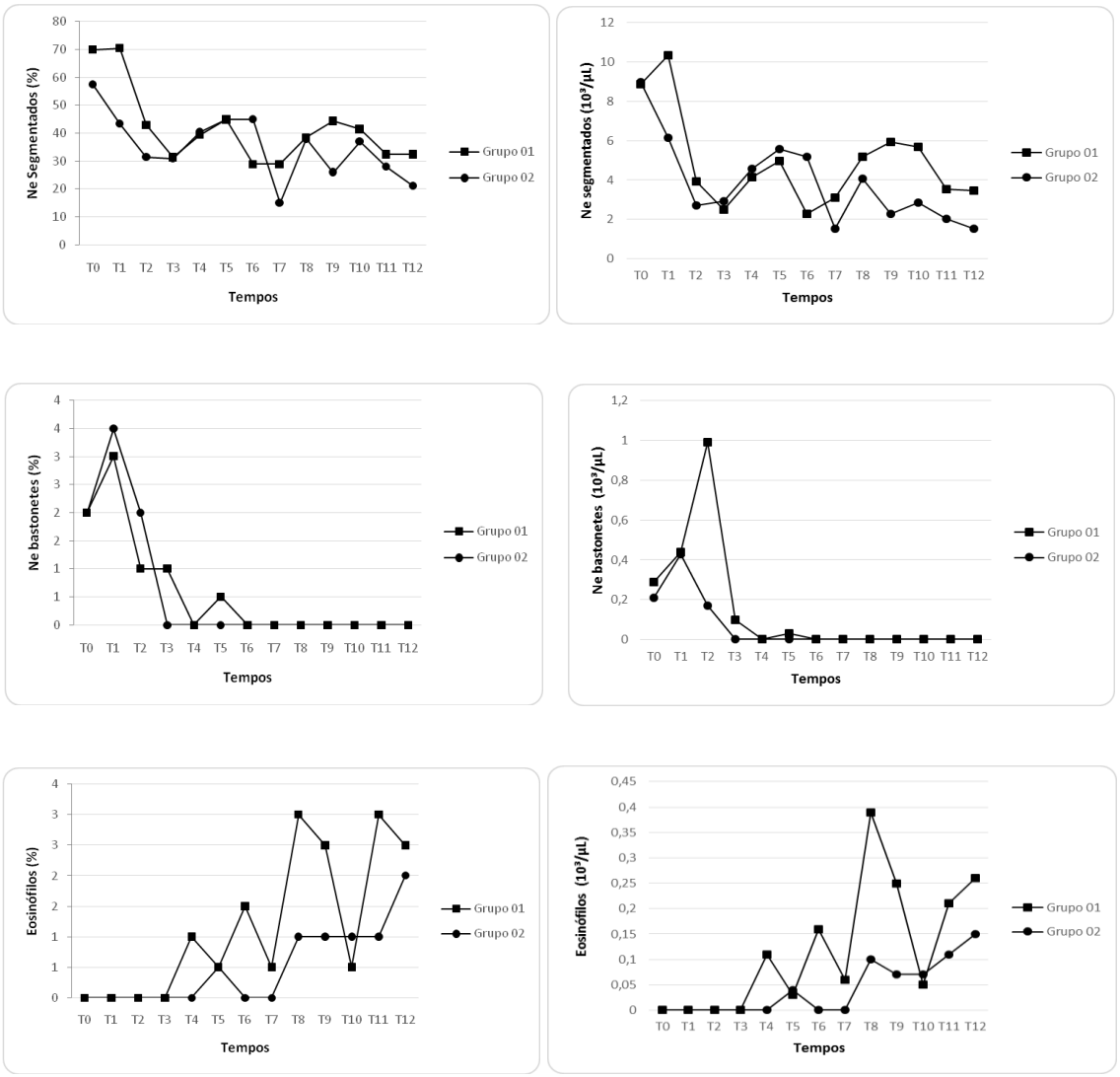
Fonte: Baccili, C. C. (2013)
Legenda: Letras A e B maiúsculas na mesma linha para cada parâmetro indicam diferença estatística entre si va comoaração entre grupos.
Bast: neutrófilos bastonetes; Seg: neutrófilos segmentados; Eos: eosinófilos; Abs: absoluto; T: tempo.

Figura 12 – Medianas dos valores relativos dos leucócitos totais (Le), e valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos mononucleares do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013)

Figura 13 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10³/µL) dos neutrófilos segmentados, bastonetes e eosinófilos do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

6.2.2 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos sanguíneos

Os valores medianos relativos e absolutos da população de linfócitos T ($CD3^+$) estão dispostos na tabela 08 e figura 14.

Os valores de linfócitos T CD3+ sofreram pequenas diferenças entre os grupos estudados. O grupo 01 apresentou maior valor mediano relativo para o $CD3^+$ no T0 (P=0,033), em seguida estes valores diminuíram e foram equivalentes do G2, porém tornaram-se maiores no T4 (P=0,055) e mantiveram-se em níveis elevados até o T7 (30 dias) em relação ao G2.

Não foram observadas diferenças nos valores absolutos e relativos (%) de $CD3^+$ antes (T0) e após (T1) a mamada de colostro; entre os momentos T1 (1 a 2 dias de vida) e T8 (60 dias de idade); T8 e T12 (180 dias de vida) (P>0,05) no grupo 02. No entanto, o grupo 01 apresentou diferenças entre os valores relativos (%) $CD3^+$ nos momentos avaliados (P=0,019); a diferença foi detectada entre os tempos T0 e T8 (P=0,048).

Os valores medianos relativos das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ do sangue dos bezerros dos grupos 01 e 02 não apresentaram diferenças entre si, com exceção das variações observadas no T12 para o $CD4^+$ (P=0,05), no T3 para o $CD8^+$ (P=0,039) e no T5 para o $WC1^+$ (P=0,05) (Tabela 09 e Figura 14).

Os valores medianos absolutos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ sofreram poucas oscilações em relação aos grupos analisados. No entanto, os auxiliares $CD4^+$ apresentaram maiores valores no G2 em comparação ao G1, estatísticamente comprovada no T4 (P=0,05) e foi maior no G1 no T12 para $CD8^+$

A população de linfócitos T gama-delta $WC1^+$ do sangue dos bezerros apesar de não ter sido observado diferença estatísca, apresentou tendência de maiores valores no G2 do T3 (5-6 dias) até T7 (30 dias).

Medianas absolutas de $CD8^+$ e $WC1^+$ foram maiores no G1 no T12 com significâncias de P=0,027 e P= 0,050, respectivamente.

Não houve diferenças entre quaisquer dos momentos avaliados (T0, T1, T8 e T12) em ambos os grupos para os valores medianos relativos de $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ (P>0,05).

Tabela 08 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) dos linfócitos T (CD3+) do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)

Tempos	**$CD3^+$**			
	Grupo 01		**Grupo 02**	
	%	Abs	%	Abs
T0	82^A	2,08	68^B	2,34
T1	81	2,79	58	1,80
T2	60	2,14	51	2,48
T3	75	3,05	62	3,58
T4	88^A	3,99	62^B	3,37
T5	70	3,16	70	2,93
T6	77	3,43	61	3,22
T7	56	3,12	49	2,74
T8	44	2,26	49	2,00
T9	58	2,47	65	3,18
T10	59	3,13	60	2,49
T11	52	3,13	57	2,27
T12	55	2,91	56	2,64

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

Legenda: Letras A e B maiúsculas na mesma linha para cada parâmetro indicam diferença estatística entre si.

Abs: absoluto; % porcentagem; T: tempo.

Tabela 09 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10^3/µL) das subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e WC1+ do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não-imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 do nascimento (T0) aos seis meses de vida (T12)

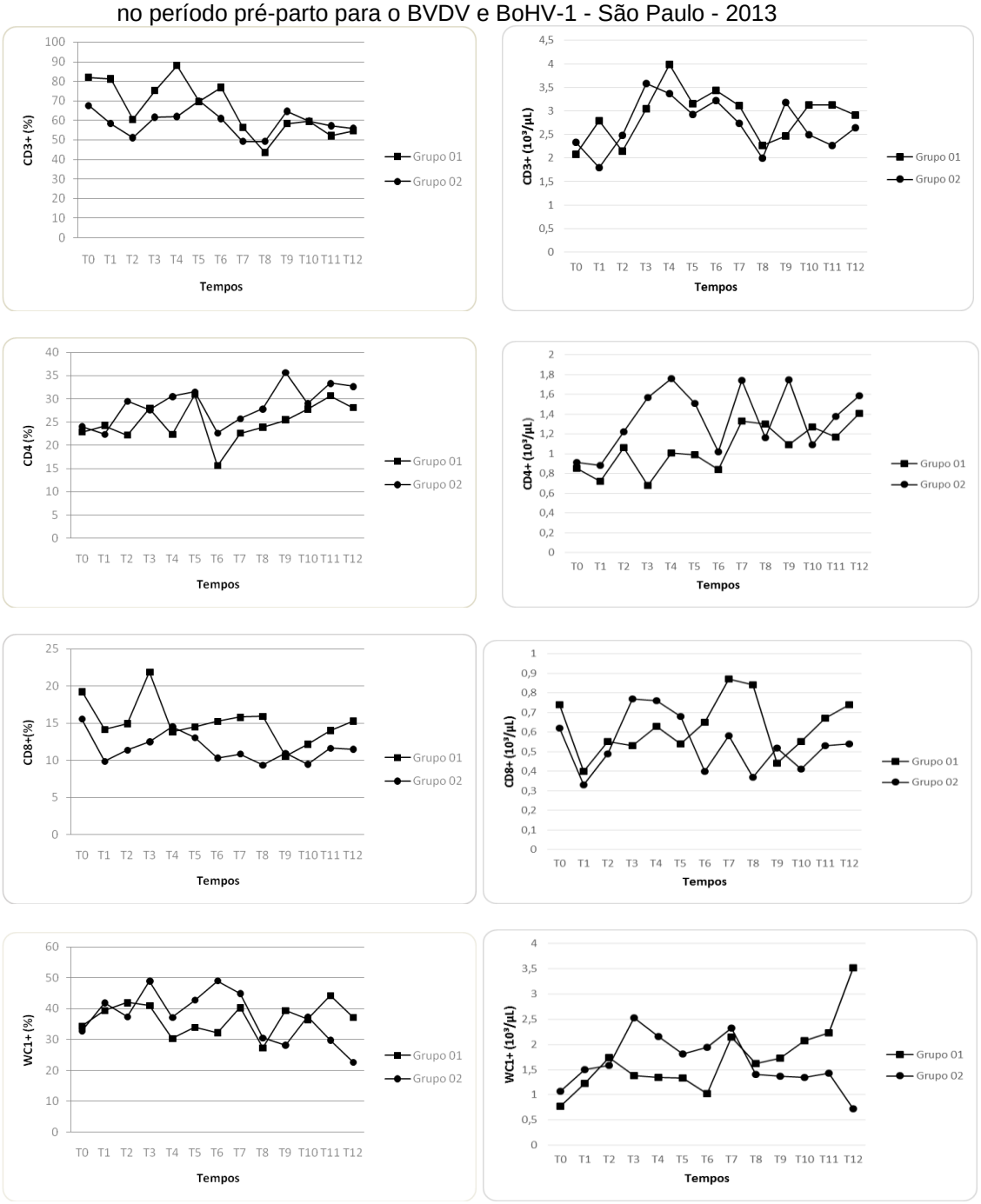
Subpopulações de Linfócitos T												
Tempos	**Grupo 01**						**Grupo 02**					
	$CD4^+$		**$CD8^+$**		**$WC1^+$**		**$CD4^+$**		**$CD8^+$**		**$WC1^+$**	
	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs
T0	23	0,85	19	0,74	34	0,77	24	0,91	16	0,62	33	1,07
T1	24	0,72	14	0,40	39	1,23	22	0,88	10	0,33	42	1,50
T2	22	1,06	15	0,55	42	1,74	30	1,22	11	0,49	37	1,58
T3	28	0,68	22^A	0,53	41	1,38	28	1,57	12^B	0,77	49	2,53
T4	22	$1,01^B$	14	0,63	30	1,35	31	$1,76^A$	15	0,76	37	2,16
T5	31	0,99	15	0,54	34^B	1,33	32	1,51	13	0,68	43^A	1,81
T6	16	0,84	15	0,65	32	1,02	23	1,02	10	0,40	49	1,94
T7	23	1,33	16	0,87	40	2,14	26	1,74	11	0,58	45	2,32
T8	24	1,30	16	0,84	27	1,62	28	1,16	9	0,37	30	1,40
T9	25	1,09	11	0,44	39	1,73	36	1,75	11	0,52	28	1,37
T10	28	1,27	12	0,55	37	2,07	29	1,09	9	0,41	37	1,35
T11	31	1,17	14	0,67	44	2,23	33	1,38	12	0,53	30	1,43
T12	28^B	1,41	15	$0,74^A$	37	$3,52^A$	33^A	1,59	11	$0,54^B$	23	$0,72^B$

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

Legenda: Letras A e B maiúsculas na mesma linha para cada parâmetro indicam diferença estatística entre si.

Abs: absoluto; % porcentagem; T: tempo.

Figura 14 – Medianas dos valores relativos (%) e absolutos (x10³/µL) das populações de linfócitos T e suas subpopulações de CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e WC1⁺ do sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas (G1) e imunizadas (G2) no período pré-parto para o BVDV e BoHV-1 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

7 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou a resposta imune celular e humoral de bezerros recém-nascidos após transferência de imunidade passiva via colostro e a influência da vacinação materna no período pré-parto para amplificação da imunidade transferida. O conhecimento da intensidade e da duração dos componentes imunitários na circulação sanguínea dos bezerros é fundamental para a identificação dos períodos de susceptibilidade, e para o estabelecimento de estratégias para imunização dos animais diante da exposição natural aos patógenos.

A imaturidade imunológica dos bezerros recém-nascidos e a supressão da sua resposta imune mediada por células (Th1) limitam sua resposta às infecções virais (MOREIN et al., 2002; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; CORTESE et al., 2009). Este fato da evidência de que as células maternas e as citocinas de memória, além das imunoglobulinas, poderiam ter papel fundamental para minimizar as infecções causadas por importantes agentes que circulam nas criações de bezerras leiteiras, tais como o BVDV e BoHV-1 (DONOVAN et al., 2007).

No Brasil, pesquisas sobre a imunidade humoral dos bezerros que receberam imunidade passiva colostral para o BVDV e BoHV-1 foram desenvolvidas (HÜBNER et al., 1996; MOREIRA et al., 2001; GATTI et al., 2010). No entanto, avaliações da resposta imune celular são escassas (LEMAIRE et al., 2000), provavelmente pela exigência de metodologias mais refinadas e trabalhosas. Além disso, o modelo para estudo desta resposta ainda não foi estabelecido, considerando-se a interface entre os componentes imunológicos do colostro e o sistema imune dos bezerros.

A discussão dos resultados obtidos nesta pesquisa será efetuada considerando-se os parâmetros da resposta imune humoral e mediada por células avaliados.

7.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Considerando a avaliação da resposta imune humoral nos bezerros utilizados nesta pesquisa, foi possível observar a presença de títulos de ACs neutralizantes para o BVDV e BoHV-1 após a mamada de colostro (T1) apenas no grupo de animais que receberam esse alimento de mães imunizadas. Apesar disso, os valores de linfócitos B $CD21^{+}$ foram iguais entre os grupos analisados.

As imunoglobulinas são produzidas pela vaca diante de estímulos antigênicos e transferidas para a glândula mamária por mecanismo ativo durante o processo de colostrogênese (BARRINGTON; PARRISH, 2001).

Bezerros são hipogamaglobulinêmicos ao nascimento, pois crescem em ambiente uterino estéril e com placentação do tipo sindesmocorial; desta forma, a resposta imune específica depende da exposição aos patógenos. Neste momento sua proteção é dependente da absorção dos ACs provenientes do colostro materno (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Considerando-se especificamente BoHV-1 e BVDV este fenômeno foi comprovado nesta pesquisa, pois todos os bezerros aparesentaram soroconversão após a mamada de colostro de mães vacinadas (100%) e seus GMTs foram diferentes, considerando os momentos T0 e T1 no G2. Estes resultados concordam com as citações de Lindberg et al. (2001) e Gatti et al. (2010).

A ausência de vacas infectadas com o vírus BoHV-1, assim como BVDV, garantida pelo teste de SN e reação da cadeia em polimerase corroboraram para que os bezerros recém-nascidos estudados não apresentassem títulos de anticorpos ao BVDV e BoHV no momento que antecedeu a mamada do colostro. A ausência de infecção durante os seis meses de experimento realizado com os bezerros também pôde ser garantida pela persistência de resultados negativos na SN para o BVDV e BoHV-1 no sangue dos bezerros do grupo 01 do nascimento (T0) aos seis meses de idade (T12). Estes cuidados foram fundamentais para a exclusão da exposição natural à estes agentes virais, garantindo como resultado apenas a resposta imune humoral induzida pela transferência de imunidade passiva.

O mecanismo de transporte dos linfócitos da circulação materna para a glândula mamária ainda é desconhecido. Apesar da capacidade funcional destas células em produzir ACs, o colostro bovino apresenta apenas 24% de linfócitos B (BARRINGTON; PARRISH, 2001; OHTSUKA et al., 2010) em relação aos 16,4% de linfócitos encontrados na secreção mamária no pós-parto imediato (GOMES et al., 2008). Além disso, a baixa concentração de linfócitos B $CD21^+$ na circulação dos bezerros após a mamada de colostro nos dois grupos experimentais sugere que estas células não foram representativamente absorvidas.

Mechor et al. (1987) também observaram altos títulos de ACs para o BoHV-1 em bezerros que ingeriram colostro de mães previamente imunizadas. Além disso, obtiveram doença grave após exposição ao vírus no grupo de animais que receberam colostro de mães não vacinadas.

Pesquisa realizada por Moreira et al. (2001) também encontraram maiores títulos de ACs para o BoHV-1 no sangue de bezerros que ingeriram colostro de mães soropositivas e vacinadas no período pré-parto em relação às mães soropositivas e não vacinadas. Desta forma, parece que a vacinação materna no pré-parto é importante para a intensidade dos títulos de ACs séricos dos neonatos.

Gatti et al. (2010) também encontraram baixos $\log_2$ GMT nos bezerros de vacas imunizadas com vacina comercial monovalente inativada para o BoHV-1 em fazendas com baixa, média e alta prevalência para o herpesvírus bovino, ao redor de 0,5 a 1,2. Estes resultados são inferiores aos valores de $\log_2$ GMT correspondentes a 6,83 obtido em nossa pesquisa. Apesar do esquema de imunização materna adotado ser igual nas duas pesquisas, pôde-se observar diferenças em relação aos constituintes das vacinas comerciais usadas, especialmente considerando-se que nesta pesquisa usou-se vacina atenuada termosensível e no trabalho de Gatti et al. (2010) foi utilizada vacina inativada, que apresenta baixa resposta vacinal, com menor duração e intensidade em relação às vacinas vivas (KELLING, 2004).

Estudos anteriores mostraram que vacas no periparto apresentaram títulos de ACs neutralizantes após imunização com vacina comercial inativada contendo a cepa *Los Angeles* do BoHV- 1 e isolado 663/Laboratório de Virologia do INTA CASTELAR do BoHV- 5 usando o hidróxido de alumínio,

como adjuvante (VASCONCELLOS et al., 2013). No entanto, os títulos de ACs maternos obtidos foram de 4 a 128. Dados ainda não publicados demostraram que os bezerros oriundos destas mães apresentaram 100% de soroconversão ao BoHV- 1, com log_2 GMT de 4 a 9, essas variações foram semelhantes às obtidas nesta pesquisa, com o uso de vacina viva atenuada.

Os títulos de ACs para o BoHV-1 diminuíram com o avançar da idade, verificando-se diferenças entre os momentos T0 e T1; T1 e T8 e T8 a T12. Foi possível detectar que o primeiro bezerro tornou-se soronegativo aos 30 dias de idade; no entanto, a maioria deles apresentou soroconversão no T9 quando tinham três meses de idade. Apenas um bezerro manteve títulos até o término deste experimento, aos seis meses de idade. Os resultados desta pesquisa foram semelhantes ao obtidos por Hübner et al. (1996), que verificaram que os bezerros começaram a apresentar resultados negativos na soroneutralização (SN) a partir dos 28 dias de vida, no entanto, alguns animais mantiveram títulos circulantes até seis meses de idade.

Todos os bezerros avaliados apresentaram títulos de ACs acima de 32, níveis considerados protetores para o BoHV-1 por Pospísil et al. (1996) após a ingestão do colostro de mães vacinadas. No entanto, dois destes animais diminuíram rapidamente seus títulos para valores menores que os protetores aos 10 dias de vida porque os níveis de ACs no colostro dessa mães deve ter sido inferior ao das outras vacas do grupo de mães vacinadas. O restante dos animais apresentou oscilações semelhantes, a partir dos 30 dias de idade.

Pesquisa anteriormente realizada por nossa equipe e ainda não publicada mostrou que 5/7 bezerros que ingeriram colostro de mães vacinadas com vacina comercial inativada apresentaram títulos de ACs para o BoHV-1 abaixo dos protetores. Os resultados obtidos nesta pesquisa foram melhores usando vacina viva atenuada termosensível para o BoHV- 1.

Moreira et al. (2001) observaram que bezerros nascidos de vacas vacinadas no pré-parto apresentavam títulos médios geométricos de ACs maiores que os demonstrados por bezerros provenientes de vacas previamente soropositivas não vacinadas.

Nossos resultados tornam-se preocupantes quando comparamos com a literatura internacional, que relataram a permanência de Acs contra BoHV-1 na circulação de bezerros até os seis a sete meses de vida (MENANTEAU-

HORTA et al., 1985). Como ressaltado anteriormente, os esquemas de imunização e manejo de colostragem adotados no Brasil são distintos daqueles de outros países e merecem atenção em relação às suas particularidades.

Para o BVDV, os bezerros também eram soronegativos ao nascimento, porém foi encontrada baixa taxa de soroconversão após a mamada do colostro (33%) no grupo de recém-nascidos que mamaram colostro de mães vacinadas. A comparação dos nossos resultados com dados de literatura foi dificultada por ausências de trabalhos avaliando a transferência de imunidade passiva específicas para o BVDV, provavelmente, pela baixa soroconversão apresentada após a ingestão de colostro, mesmo em mães imunizadas no pré-parto.

Apesar da baixa taxa de soroconversão, parece que a intensidade da resposta imune dos bezerros ao BVDV foi mais intensa que para o BoHV- 1, pois a soroconversão dos animais foi mais tardia, aos três meses de vida. E os títulos abaixo dos protetores (16) citados por Ridpath e Bolin (1995) foram detectados também a partir dos 90 dias de vida. A maior intensidade da resposta humoral ao BVDV pode ter relação com a composição da vacina que era inativada, pois as vacinas vivas atenuadas possuem padrão de resposta imune mediada por células (Th1).

Silva (2006) demonstrou que a resposta imunogênica de seis vacinas multivalentes inativadas comercializadas no Brasil para o BVDV foi fraca, destacando que apenas uma vacina, de origem americana, promoveu títulos neutralizantes para esse agente viral. Provavelmente as vacas vacinadas nesta pesquisa apresentaram padrão de resposta à vacina semelhante ao observado por Silva (2006), desta forma, apenas 2/6 das mães vacinadas tinham Acs neutralizantes para o BVDV no colostro ingerido pelos recém-nascidos.

A diferença entre o padrão de resposta humoral para o BVDV e BoHV-1 pode ser atribuída ao tipo de inóculo utilizado, pois a vacina usada nesta pesquisa, para o BVDV, continha as estirpes 5960 e 53637 do BVDV-1 e BVDV-2, respectivamente inativadas, ao passo que o inóculo utilizado para o BoHV-1 era atenuado e termosensível. A revisão de literatura de Kelling (2004) que trata da vacinação para o BVDV, ressalta que as vacinas vivas possuem maior intensidade de resposta que as inativadas. Por questões de

biosegurança, apenas as vacinas inativadas para o BVDV podem ser comercializadas no Brasil (FLORES et al., 2005).

Segundo Del Fava (2003), o controle da Diarreia Viral Bovina no país pode ser realizado com o emprego de vacinas inativadas, porém, como o vírus da BVD apresenta grande variabilidade antigênica, é questionável a eficiência das vacinas disponíveis no mercado, pois não é conhecido se as cepas virais utilizadas em sua produção possuem espectro antigênico suficientemente amplo para proteger os animais contra as cepas que ocorrem no campo. A baixa resposta cruzada entre as diferentes cepas de BVDV foram detectadas no trabalho desenvolvido por Vogel et al. (2002).

Com base nos resultados apresentados pode-se verificar que a vacinação materna foi fundamental para a transferência de ACs ao BVDV e BoHV-1, pois os bezerros que receberam colostro de mães soronegativas e não vacinadas não transferiram ACs específicos para a sua prole. No entanto, a persistência de ACs maternos circulantes apresentada por alguns bezerros foi curta e pode implicar em susceptibilidade dos bovinos jovens ainda em fase de amadurecimento imunológico.

7.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

Foi observada tendência para elevações nos valores de leucócitos totais e de linfócitos na circulação sanguínea dos bezerros que ingeriram colostro de mães imunizadas no pré-parto. É válido ressaltar que o número de animais utilizados nesta pesquisa foi pequeno em função da extensão do período experimental, que compreendia a criação dos bezerros do nascimento até os seis meses de idade. Este fato, implicou em maiores dificuldades para demonstrar as diferenças entre os grupos experimentais.

A maioria das oscilações nos valores de leucócitos totais, linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos ocorreu a partir dos episódios inflamatórios observados na maioria dos bezerros a partir do oitavo dia de vida, oriundas do início dos quadros de diarreias e inflamações umbilicais.

O grupo de animais que recebeu colostro de mães não-imunizadas no período pré-parto apresentou maior intensidade na resposta inflamatória, caracterizada por maiores valores de leucócitos totais e fagócitos mononucleares e polimorfonucleares.

A princípio, o estudo do leucograma não foi uma ferramenta eficiente para a avaliação da transferência passiva dos componentes via colostro. No entanto, a dinâmica das células mediante a exposição natural aos patógenos apontou para diferenças na gravidade do processo inflamatório, sendo de menor intensidade nos bezerros que ingeriram colostro de mães não imunizadas. Desta forma, células, citocinas ou Acs específicos no colostro das mães imunizadas podem ter representado um papel fundamental na proteção dos bezerros nos primeiros meses de vida.

Reber et al. (2006) observaram em sua pesquisa que a ausência de células no colostro fornecido a bezerros recém-nascidos implicou em proporção de leucócitos expressando moléculas indicadoras de processo inflamatório como o $CD43^{+}$ e o CD11a, responsáveis pela movimentação extra-vascular e endotelial de leucócitos. Estes autores ressaltaram que os bezerros que ingeriram colostro acelular apresentaram maior frequência de quadros inflamatórios. Apesar dos indicadores usados para avaliar a resposta imune dos bezerros ser distinta das usadas nesta pesquisa, pode-se supor que a absorção das células do colostro seja fundamental para a proteção dos recém-nascidos.

Apesar de não ser objetivo desta pesquisa, foi possível observar oscilações entre os tipos leucocitários durante o acompanhamento dos bezerros do nascimento aos seis meses de vida. Ao nascimento foi observada diminuição da população de neutrófilos segmentados e aumento das populações de linfócitos e eosinófilos, conforme variações etárias decorrentes especialmente da liberação de cortisol materno e fetal durante o trabalho de parto (BENESI et al., 2012, BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND, 2006). É válido ressaltar que importantes revisões de literatura sobre imunidade em bezerros verificaram que, apesar do maior valor de neutrófilos segmentados ao nascimento, a fagocitose e atividade microbicida destas células estão diminuídas (BARRINGTON et al., 2001; CHASE, HURLEY; REBER, 2008).

As oscilações observadas para os linfócitos T $CD3^+$ e suas subpopulações, obtidos por citometria de fluxo também parecem ser influenciados pelos quadros inflamatórios do grupo de bezerros que mamaram colostro de mães não-vacinadas. A partir do T4 (oito dias), as proporções de $CD3^+$ foram maiores no grupo de bezerros filhos de mães não-vacinadas e mantiveram concentrações elevadas em relação ao grupo de bezerros do G2 até os trinta dias de vida.

Aos 60 dias de vida foi possível verificar uma menor população de linfócitos T $CD3^+$ no G1, em relação aos valores obtidos ao nascimento. É válido ressaltar que estes bezerros não apresentaram ACs específicos ao BoHV- 1 e BVDV; esta oscilação também foi verificada nos filhos de mães vacinadas comparando-se o T0 e T8. A partir deste momento, os títulos de Acs específicos encontrados em todos os bezerros do G2 encontravam-se abaixo do nível protetor para o BoHV- 1. Desta forma, acredita-se que este momento representa um período de susceptibilidade às enfermidades.

Os maiores valores absolutos de linfócitos T $CD4^+$ foram encontrados no grupo de bezerros que ingeriram colostro de mães vacinadas. Este fenômeno é muito importante em relação à defesa dos bezerros aos patógenos infecciosos, pois essas células são responsáveis pela modulação da resposta imune específica por meio da liberação de citocinas com padrões distintos de resposta celular (Th1) ou humoral (Th2). A ativação das células auxiliares $CD4^+$ ocorrerá pela apresentação do antígeno pelas células que apresentam o MHC de classe II, como os macrófagos, célula predominante no colostro bovino (69,5%). Em trabalho desenvolvido por Reber et al. (2008 a,b) concluíram que a transferência das células maternas do colostro permitiu o desenvolvimento mais rápido dos linfócitos sanguíneos em bezerros recém-nascidos. Os autores atribuem este fenômeno a grande quantidade de macrófagos presentes na secreção mamária, que seria a chave para ativação da RI específica em neonatos. Este mecanismo pode ter sido o diferencial para menor intensidade da resposta inflamatória nos animais que mamaram colostro de mães vacinadas.

A população de linfócitos T efetores citotóxicos ($CD8^+$) foi muito semelhante nos dois grupos estudados. Apesar de não haver diferença estatística nos valores medianos de células T gama-delta notou-se que os

valores no grupo de bezerros que ingeriram colostro de mães vacinadas apresentou maior número dessas células até os primeiros trinta dias de vida.

As células gama-delta representam a maior população de linfócitos na circulação periférica de ruminantes, especialmente em bezerros neonatos onde esses linfócitos representam até 50% das células mononucleares sanguíneas. Esta grande proporção sugere sua importância na ativação da RI específica dos bezerros ao início da sua vida. Essa célula possui características relacionadas ao reconhecimento do antígeno e liberação de citocinas com padrão de resposta predominantemente celular, além de possuir ações efetoras semelhantes aos linfócitos citotóxicos.

Considerando as análises realizadas aos seis meses de idade (T12) pôde-se observar oscilações nas subpopulações de linfócitos T, provavelmente estes animais sofreram algum desafio ambiental no período.

As oscilações etárias nas subpopulações de linfócitos obtidas pela citometria de fluxo foram referentes às proporções de $CD21^+$ que apresentaram aumento nos seus valores relativos e absolutos ao nascimento até os seis meses de idade. A população de linfócitos T $CD3^+$ apresentou poucas oscilações durante o período estudado. Nossos resultados são condizentes com os achados de Kampen et al. (2006) e Wilson et al. (1996).

Os resultados obtidos nesta linha de pesquisa representam o início de estudos para entendimento da resposta imune celular de bezerros após imunização passiva. A escassez de conhecimentos sobre o papel de alguns componentes imunológicos do colostro, tais como células e citocinas, considerando-se a interface imunidade passiva *versus* resposta imune dos neonatos dificulta a escolha dos mecanismos a serem estudados e técnicas imunológicas mais apropriadas para a avaliação desta resposta.

Com base nos resultados obtidos pôde-se verificar que o leucograma deve ser usado como parâmetro indicativo de processo inflamatório. Em relação às análises de citometria de fluxo pôde-se concluir que a determinação das subpopulações de linfócitos podem ser usadas para avaliar a resposta imune dos bezerros, entretanto, a interpretação e conhecimentos de mecanismos imunes deveriam ser feitos por meio de avaliações funcionais.

A vacinação materna no período pré-parto influenciou nas proporções de células $CD4^+$ e gama-delta $WC1^+$ e menor intensidade na resposta inflamatória

mediante exposição natural aos patógenos durante os seis meses de vida dos bezerros avaliados.

8 CONCLUSÕES

Com base nos resulatdos obtidos nesta pesquisa pôde-se concluir:

1. A vacinação materna influenciou na transferência de ACs específicos aos bezerros, especialmente para o BVDV;
2. Títulos protetores para o BoHV-1 (>32) foram constatados nos bezerros que receberam colostro de mãe vacinadas até os primeiros três meses de vida;
3. As taxas de soroconversão para o BVDV após a ingestão de colostro de vacas vacinadas foram baixas;
4. Bezerros que ingeriram colostro de vacas imunizadas apresentaram maior resposta celular, verificada pela maior proporção de células T auxiliares $CD4^{+}$;

CAPÍTULO 2 - RESPOSTA VACINAL DE BEZERROS AO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) E HERPESVÍRUS BOVINO TIPO- 1 (BoHV-1)

9 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o herpesvírus bovino tipo -1 (BoHV-1) são agentes relacionados às doenças respiratórias, infecção fetal, doença neonatal e reprodutivas; responsáveis pela crescente preocupação econômica que originaram programas e estratégias de imunização para pecuária de leite e corte com o intuito de controlar essas doenças (LINDBERG, 2003).

Ao término da imunidade colostral para o BVDV e BoHV-1, ao redor de quatro a seis/sete meses de idade (MENANTEAU-HORTA et al., 1985; HUBNER et al., 1996) observa-se agravamento das manifestações clínicas ocasionadas pelas infecções ocasionadas por esses agentes (BABIUK et al., 2004). Provavelmente este fenômeno ocorre pela imaturidade imunológica dos bovinos jovens até a puberdade que lhes confere com capacidade limitada para montar resposta imune aos patógenos (KAMPEN et al., 2006; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Esquemas de vacinação a partir dos seis meses de idade são recomendados como estratégia para estimular a imunidade ativa e minimizar as manifestações clínicas ocasionadas pelo BoHV-1 ou BVDV. No entanto, a interface entre a imunidade colostral *versus* imunidade ativa, dependente do manejo de colostragem, qualidade do colostro e do desafio antigênico encontrado no período, implicam em opiniões contraditórias e ausência de consenso sobre o momento ideal para a vacinação dos bovinos jovens (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Bolin e Ridpath (1995) estudaram a transferência de Acs para o BVDV via colostro e sua capacidade para a proteção de bezerros pós-exposição ao vírus. Nesta pesquisa concluíram que títulos de Acs séricos abaixo de 16 não

protegiam os bezerros da doença aguda e recomendaram a vacinação dos animais a partir desse momento.

Menanteau-Horta et al. (1985) avaliaram a resposta imune humoral induzida pela vacinação com o BVDV vivo e modificado, em bezerros com diferentes concentrações de ACs maternos circulantes, distribuídos em três grupos experimentais: grupo A - bezerros vacinados aos 84 e 196 dias de idade; grupo B – bezerros vacinados apenas com 196 dias de vida; grupo C – bezerros não vacinados. No grupo C foi possível verificar que os anticorpos maternos para o vírus permaneceram na circulação dos animais até seis meses de idade; os bezerros dos grupos A e B aumentaram sua titulação de anticorpos após a vacinação. Nesse caso, acredita-se que os animais do grupo A com aproximadamente 3 meses de idade não continham altos títulos de anticorpos maternos circulantes, assim, a imunidade ativa desses bezerros pôde ser estimulada.

Radostits et al. (2007) recomendam a vacinação de bezerros jovens com vírus vivo atenuado quando os títulos de Acs para o BoHV-1 forem menores que 32.

Ellis et al. (2001) demonstraram que altos títulos de Acs maternos podem bloquear a imunidade humoral dos bezerros induzida pela vacinação mas não a atividade celular. Estes dados foram confirmados nas pesquisas desenvolvidas por Ridpath et al. (2003), Endsley et al. (2004), Platt et al. (2008) e Platt et al. (2009), que demonstraram amplificação da resposta imune celular e diminuição da gravidade nas re-infecções após vacinação de bezerros com vacina viva atenuada em presença de altos títulos de Acs maternos circulantes.

A importância da resposta mediada por células na resposta às infecções e proteção dos bezerros para os agentes virais foi destacada em importante revisão de literatura escrita por Chase; Elmowalid; Yousif (2004) e Levings & Roth (2013).

Em bovinos a atuação das células T gama-delta na defesa de animais ruminantes tem sido destacada por representar a maior proporção das subpopulações de células T em ruminantes equivalente a 60% (GUZMAN et al., 2011). Evidências sugerem que estas células são importantes na defesa contra patógenos, incluindo o BoHV-1 e BVDV (QUADE; ROTH, 1999; ENDSLEY et al., 2002 e 2003).

A avaliação da resposta celular tem sido realizada pela análise da resposta proliferativa de linfócitos ou produção das citocinas IFN-gama e IL-2 (interleucina). Proliferação e citotoxicidade são importantes indicadores no diagnóstico da resposta antígeno-específica de células T de memória para a vacina, no entanto, essas técnicas são trabalhosas e envolvem o uso de material radioativo. Pesquisas têm demonstrado que o marcador $CD25^+$ tem alta afinidade com a cadeia alfa do receptor de interleucina-2, muito sensível para detecção da ativação das subpopulações de células T, expresso exclusivamente na superfície dos linfócitos T após o reconhecimento antígeno específico (QUADE; ROTH, 1999; ENDSLEY et al., 2002). A ligação entre IL-2 e seu receptor induz a mitose de clones de linfócitos antígeno-específicos (ENDSLEY et al., 2003).

As subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e gama-delta reconhecem o antígeno de forma diferentes, sendo este um fator extremamente importante para determinar se a vacina é capaz de ativar cada uma dessas subpopulações (ENDSLEY et al., 2002).

Quade & Roth (1999) avaliaram a resposta mediada por células em bezerros com quatro meses de idade, após estímulo com vacina comercial contendo o BoHV-1 atenuado. Realizaram cultivo das células mononucleares sanguíneas estimuladas com o BoHV atenuado, que foram incubadas por seis dias e marcadas com receptores específicos para células T ($CD3^+$) auxiliares ($CD4^+$), citotóxicas ($CD8^+$), gama-delta ($WC1^+$) e $CD25^+$. Nesta pesquisa observaram maior expressão de $CD25^+$ na população de linfócitos T e suas subpopulações $CD4^+$ e gama-delta após estímulo in vitro com o BoHV no grupo de animais vacinados. Células citotóxicas $CD8^+$ de bezerros vacinados não apresentaram aumento na expressão do marcador $CD25^+$.

Seguindo modelo semelhante ao usado por Quade & Roth (1999) outro trabalho foi desenvolvido usando bovinos com 12 a 16 meses, e mostrou que as células T $CD8^+$ também poderiam ser ativadas quando estimuladas com o BoHV- 1 vivo (ENDSLEY et al., 2002).

A eficácia das vacinas inativadas para o BVDV na estimulação de resposta celular foi menor que os imunógenos atenuados e não resultam em ativação de células T estimulados in vitro com BVDV-1 e BVDV- 2 no trabalho de Endsley et al. (2003). Por outro lado, parece que esta resposta possui

relação com o adjuvante usado na composição das vacinas, pois, outra pesquisa relatou maior produção de ACs neutralizantes, interferon-gama e expressão de $CD25^+$ por leucócitos mononucleares estimulados com o BVDV-1 e BVDV-2. Neste último caso foram usadas as substâncias “Quil A, colesterol e amphigen” (PLATT et al., 2008).

Anticorpos neutralizantes para BVDV também tem sido amplamente usados para avaliação da resposta imune às vacinas (PLATT et al., 2008).

Vogel et al. (2002) avaliou a resposta sorológica de três vacinas inativadas comerciais para o BVDV- 1 e BVDV- 2 em bovinos jovens de sete a 24 meses de idade. Nesta pesquisa observaram soroconversão de 74,5% (70/94) para o BVDV- 1 e 52,1 % (22/94) para o BVDV- 2 aos 30 dias após 2°dose da vacina. Os títulos médios geométricos (GMT) contra o BVDV eram de 109,3; 54,6; e 25,5 para as vacinas A, B e C, respectivamente. Para o BVDV- 2 foram enontrados os GMTs de 19, 42,3 e 18,4. Estes títulos reduziram rapidamente em 180 dias e apenas 31,9 dos animais já não apresentavam atividade neutralizante para o BVDV- 1 e 63,8% para o BVDV- 2, apontando para a necessidade das revacinações. Esses resultados demonstram que a vacinação não induziu uma resposta sorológica de magnitude e duração adequadas na maioria dos animais, principalmente frente à grande diversidade antigênica das amostras de BVDV.

A inter-relação entre a imunidade colostral *versus* ativa, diante de uma etapa crítica de desafios e desenvolvimento imunológico pode predispor os bezerros jovens às infecções virais responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade.

Diante desses fatos, o objetivo geral desta pesquisa é avaliar a resposta imune humoral e celular para o BVDV e BoHV- 1 em bezerros jovens, mediante estímulo vacinal após término da imunidade colostral.

10 MATERIAL E MÉTODOS

10.1 SELEÇÃO BEZERROS

Foram selecionados 10 bezerros recém-nascidos, machos (n=2) e fêmeas (n=8), da raça Holandesa, provenientes da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) – Gado de Leite, localizada na cidade de Nova Odessa.

10.2 COLOSTRAGEM

Os partos foram acompanhados e os recém-nascidos separados de suas mães para controle da imunização passiva. Os bezerros receberam seis litros de colostro de suas respectivas mães nas primeiras 12 horas de vida. As mães foram vacinadas no periparto com vacina comercial, contendo as estirpes do BVDV tipo 01 (5960) de um isolado em Lowa (EUA), BVDV -2 (53637) inativadas de um isolado de Ontario (EUA) e BoHV-1 (RLB103).

10.3 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO

Aos quinze dias de vida, os recém-nascidos foram transferidos para a Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) da FMVZ/USP onde permaneceram até os oito meses de idade (240 dias de vida). Durante o período experimental, os bezerros foram mantidos isolados para evitar exposição natural ao BVDV e BoHV-1.

Os animais foram alimentados com 6L de sucedâneo lácteo[8] durante a fase de amamentação, além do fornecimento de ração comercial[9], feno, sal mineral e água "*ad libitum*".

O desmame gradual foi realizado a partir de dois meses de idade, aumentando-se a quantidade de ração para 3Kg ao dia. Em seguida, ao redor dos três meses de idade, foram realizadas as mochações.

10.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os bezerros, quando atingiram seis meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais compostos de cinco animais: animais não vacinados (VAC-); e animais vacinados (VAC+) (Quadro 09).

Quadro 09- Distribuição dos bezerros do grupo VAC (+) e manutenção grupo controle de animais não-vacinados VAC (-)

Grupos	Id. Experimento	Id. Fazenda
VAC (-)	A	1567
	B	1568
	C	1569
	D	759
	E	763
VAC (+)	F	1548
	G	1552
	H	1560
	I	1563
	J	758

Id: Identificação
Fonte: Baccili, C. C. (2013).

10.5 PROTOCOLO DE VACINAÇÃO (VAC +)

Os bezerros (n=5) pertencentes ao grupo VAC (+) foram vacinados com a primeira dose da vacina aos 180 dias pós-nascimento (p.n.) e revacinados aos 210 dias de vida, com vacina comercial contento as estirpes/cepas do BVDV tipo 01 (5960) de um isolado em Iowa (EUA), BVDV tipo 2 (53637) inativadas de um isolado de Ontario (EUA) e BoHV-1 (RLB103).

[8] Lacthor®, Tortuga
[9] Ração para bezerros®, Agromix

Foi aplicada a dose de 5mL da vacina comercial por via subcutânea na região da tábua do pescoço (Figura 15).

Figura 15 – Aplicação subcutânea de vacina comercial para o BVDV nos bezerros do grupo VAC (+) - São Paulo - 2013

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

10.6 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Foram colhidas amostras de sangue dos bezerros em tubos contendo EDTA, com capacidade de 4mL, para avaliação das subpopulações de linfócitos sanguíneos; em tubos com heparina, (40mL) para realização do cultivo dos leucócitos sanguíneos mononucleares e avaliação da produção de interferon-gama (IFN-gama), e em tubos sem anticoagulante com ativador de coagulação (8,5mL), para a titulação de anticorpos específicos para BVDV e BoHV-1.

As colheitas das amostras de sangue dos bezerros foram realizadas em diferentes momentos, conforme ilustrado no quadro 10.

Quadro 10 - Momentos padronizados para colheitas das amostras de sangue e soro dos bezerros aos 180 dias (T0), 210 dias (T1) e 240 dias (T2) de vida

Momentos das colheitas	
Tempo Zero (T0)	Antes aplicação da 1°dose
Tempo 1 (T1)	Antes aplicação da 2°dose
Tempo 2 (T2)	30 dias após aplicação 2°dose

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

10.7 EXAMES LABORATORIAIS

a) Identificação das Subpopulações dos Linfócitos e Expressão do $CD25^+$

As subpopulações dos leucócitos sanguíneos foram determinadas usando anticorpos monoclonais específicos para receptores de superfície celular, associados com marcadores de diferenciação e ativação, pela técnica de citometria de fluxo, conforme painel de anticorpos selecionados (Quadro 11).

Foram transferidos 100µL de sangue total obtido em tubos com EDTA, para tubos de citometria de fluxo. A lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 900µL de solução comercial[10] para essa finalidade, que permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada à 282 G por 8 minutos; o sobrenadante desprezado e os leucócitos sanguíneos ressuspendidos em 1 mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), a mistura foi novamente centrifugada para lavagem das células. Por fim, acrescentou-se 1 mL de PBS ao “pellet” de leucócitos.

Para marcação das células foram adicionados 1µg dos anticorpos monoclonais primários nas suspensões celulares, mantidas sobre gelo triturado por 30 minutos, e novamente lavadas em solução de PBS. Em seguida, foi adicionado 1 a 10 µg de anticorpos monoclonais secundários, utilizando-se os fluorocromos[11] FITC (*Fluorescente Isothiocyanate*), PE (*Phycoerythrin*) e PERCP (*Peridinin-Chlorophyll Proteins*) (Quadro 12). Após 30 minutos sobre gelo, em ambiente escuro, as amostras foram novamente submetidas à lavagem e ressuspendidas com solução de PBS (1mL) e reservadas para avaliação das fluorescências emitidas nos comprimentos de onda 488-525

[10] Facslysing, Becton Dickinson
[11] Invitrogen® e Becton Dickinson Immunocytometry System®

(FITC), 488-575 (PE) e 488-675 (PERCP) em citômetro de fluxo[12]. Os ensaios realizados estão discriminados no quadro 13.

Foram adquiridos cinqüenta mil eventos utilizando-se o programa CellQuest Pro®[13] que foram avaliados quanto à fluorescência emitida pelos anticorpos secundários utilizando-se o programa FlowJo®, versão 7.2.5.

Nesta etapa, foi possível selecionar a população de células mononucleares pelo seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 16). Inicialmente verificou-se a expressão do marcador $CD3^+$ dentre a população selecionada (Figura 16) para a seguir identificar suas subpopulaçoes $CD8^+$, $CD4^+$ e gama-delta ($WC1^+$) e a expressão do receptor de IL-2 ($CD25^+$) por essas células (Figura 17).

A expressão do marcador $CD21^+$ (linfócitos B) também foi verificada dentre os leucócitos mononucleares (Figura 18). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (%) de células marcadas.

Quadro 11 – Anticorpos monoclonais primários usados nas marcações e determinações nas subpopulações de linfócitos T (αβ TCR e γδ TCR) e população de linfócitos B

Anticorpo	**Isótipo**	**Especificidade**	**Clone**
Mouse anti-bovine CD3	IgG1	Linfócito T αβTCR.	MM1A
Mouse anti-bovine CD4	IgG2a	Linfócito T αβTCR.	IL-A11
Mouse anti-bovine CD8	IgM	Linfócito T αβTCR.	BAQ111A
Mouse anti-bovine WC1-N1	IgM	Linfócito Tγδ TCR	B7A1
Mouse anti-bovine B-lymphocytes	IgG1	Linfócito B	GB25A
Mouse anti-bovine CD25	IgG2a	Receptor de Interleucina 2 (IL-2)	CACT108A

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Quadro 12- Anticorpos secundários usados para marcação dos Acs monoclonais primários e detecção dos marcadores celulares

Anticorpos Secundários	Isotipo	Referência	Fonte
Goat anti-mouse	IgM	M31501	Invitrogen®, EUA
Goat anti-mouse	IgG2a	M32204	Invitrogen®, EUA
Rat anti-mouse	IgG1	Cat. 340272	Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

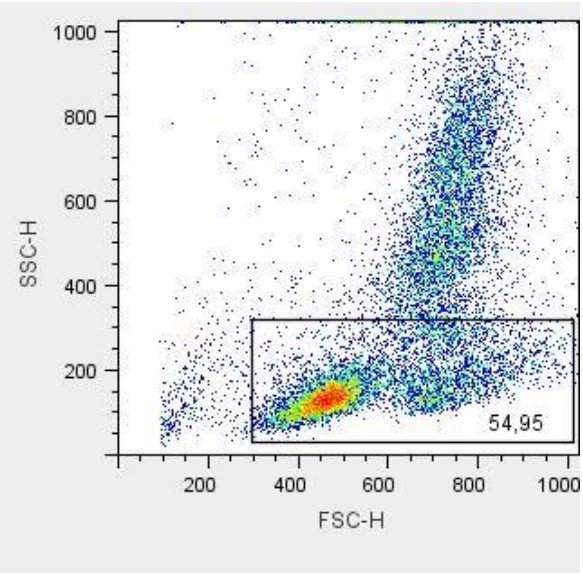
[12] FACSCalibur flow citometer®, Becton Dickinson Bioscience
[13] Becton Dickinson Biosciences

Quadro 13 – Ensaios realizados para a determinação das subpopulações e identificação do $CD25^+$ nos linfócitos sanguíneos de bezerros dos grupoS VAC (-) e VAC (+)

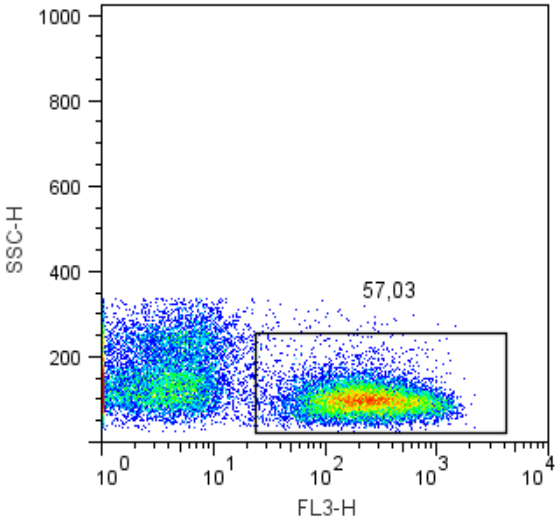
Calibração	Branco	Células
Compensações Fluorescências		Células WC1+**FITC**
		Células CD25 + **PE**
		Células CD3 + **PERCP**
Ensaios	Ensaio “A”: Linfócitos Tαβ auxiliar	Células $CD3^+$/PERCP $CD4^+$/FITC $CD25^+$/PE
	Ensaio “B”: Linfócitos Tαβ citotóxico	Células $CD3^+$/PERCP $CD8^+$/FITC $CD25^+$/PE
	Ensaio “C”: Ativação de Linfócitos Tγδ	Células $CD3^+$/PERCP $WC1^+$/FITC $CD25^+$/PE
	Ensaio “D”: Linfócitos B	CD21+/PERCP

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

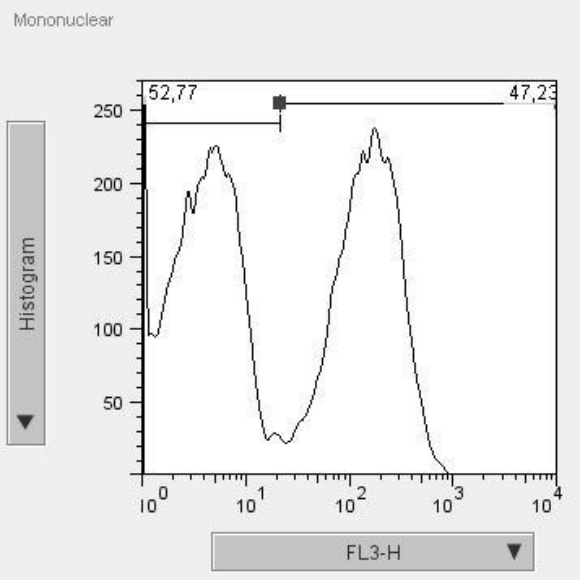
Figura 16- Passos para determinação da população de células CD3⁺ usando o Programa Flowjo - São Paulo - 2013



(a) Identificação da populações dos leucócitos mononuclares pelo seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) no gráfico dotplot



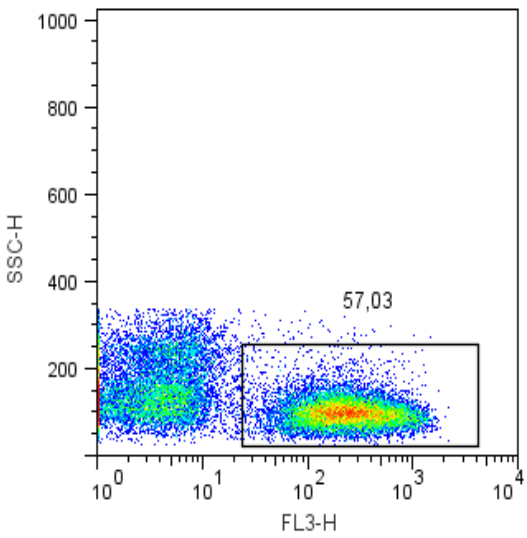
(c) Seleção da população de células expressando o marcados CD3⁺ (FL3⁺) para identificação das células T no gráfico dotplot



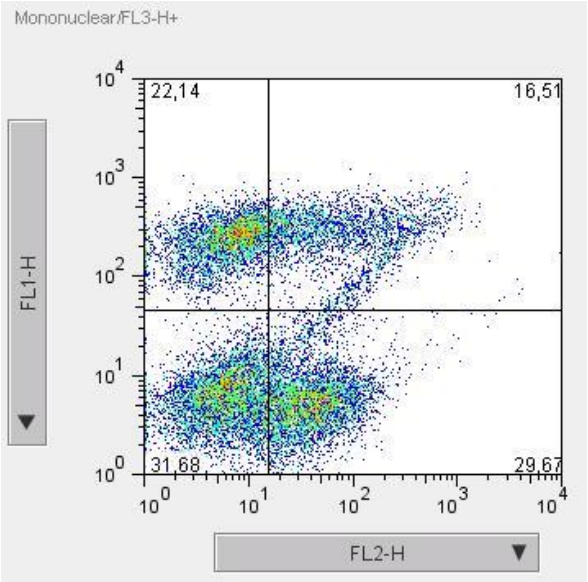
(b) Histograma monstrando a população positiva para as células T expressando marcador CD3⁺

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

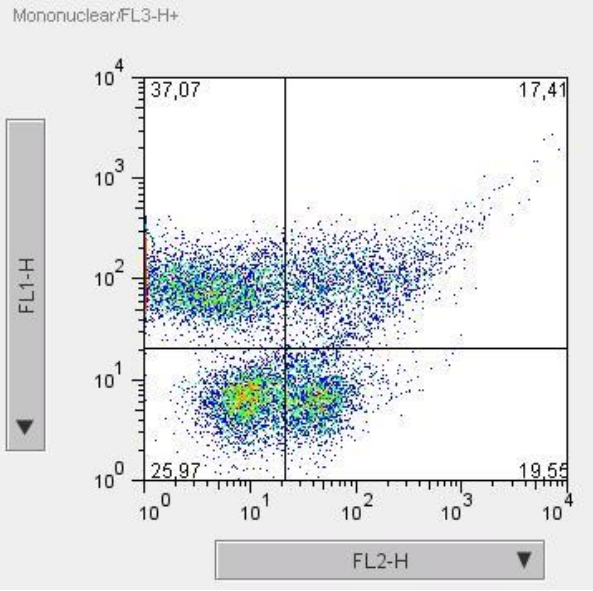
Figura 17- Passos para determinação das subpopulações de células CD3⁺, CD8⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD25⁺ e WC1⁺/CD25⁺ usando o Programa Flowjo - São Paulo - 2013



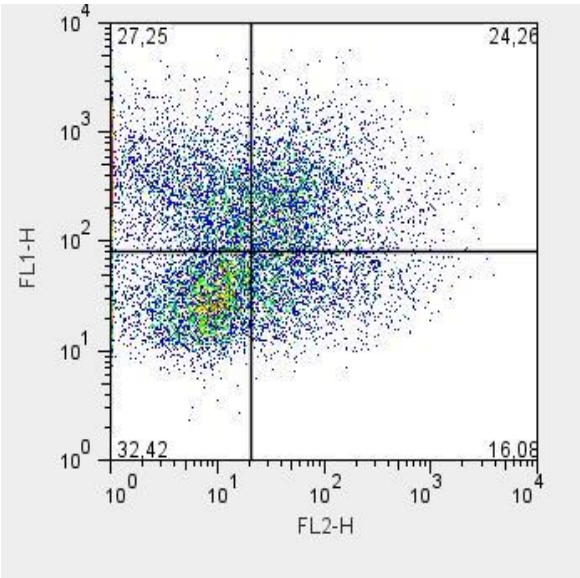
(a) Seleção da população de linfócitos T CD3⁺ (FL3⁺)



(b) Quadrante superior direito (duplo positivo) mostra a população de linfócitos citotóxicos duplamente marcados com o CD8⁺ (FL1) e CD25⁺ (FL2)

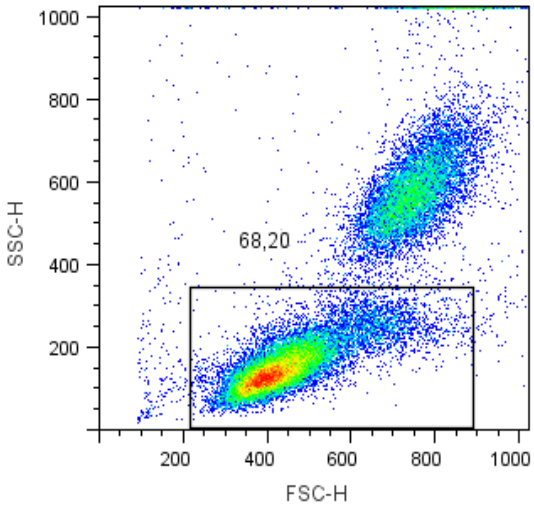


(c) Quadrante superior direito (duplo positivo) mostra a população de linfócitos auxiliares duplamente marcados com o CD4⁺ (FL1) e CD25⁺ (FL2)
Fonte: Baccili, C. C. (2013)

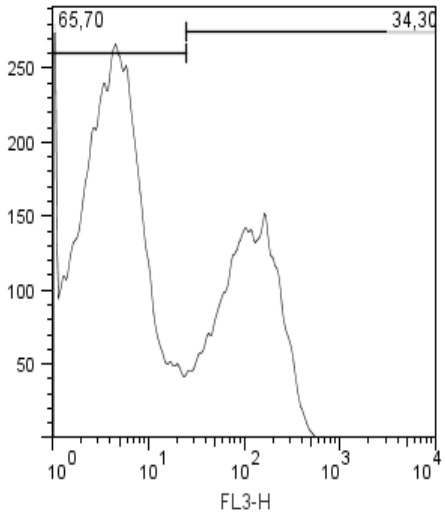


(d) Quadrante superior direito (duplo positivo) mostra a população de linfócitos gama-delta duplamente marcados com o WC1⁺ (FL1) e CD25⁺ (FL2)

Figura 18- Passos para determinação da população de células B CD21+ usando o Programa Flowjo - SãoPaulo - 2013



(a) Identificação da populações dos leucócitos mononuclares pelo seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) no gráfico dotplot.



(b) Histograma monstrando a população positiva para as células T expressando marcador $CD21^+$ (FL3+).

Fonte: Baccili, C. C. (2013)

b). Detecção de anticorpos específicos para o BVDV E BoHV-1

O soro sanguíneo dos bezerros foi colhido em tubos sem anticoagulante, centrifugados a 1.223 G por 10 minutos. Após a retração do coágulo, o soro foi retirado e acondicionado em microtubos e conservados à -40°C até o término das colheitas das amostras.

A técnica de soroneutralização (SN) foi realizada de acordo com a Organização Internacional de Epizootias (2008) no Laboratório de Viroses de Bovídeos – Instituto Biológico.O sangue dos bezerros obtido em tubos sem anticoagulante foi usado para obtenção soro sanguíneo usado no teste de soroneutralização (SN) e a detecção de anticorpos neutralizantes para o BVDV foi feita após prévia inativação das amostras a 56°C por 30 minutos. Foi utilizada placas de poliestireno de 96 cavidades, com uma diluição constante do soro, na base logarítmica 2, a partir da diluição 1:5 até 1:5120, tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM (Minimum Essential Medium). Feita a diluição das amostras, foi adicionado à placa 50 µL da solução "estoque" contendo 100 $TCID_{50}$ (50% *tissue culture infective doses*) da cepa citopatogênica NADL do BVDV. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO2. Após este período, as placas receberam 50µL de suspensão de células MDBK na concentração de 3 x 10^5 células/mL, em cada cavidade. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO2 durante 4 a 5 dias.

Para detecção de anticorpos neutralizantes para o BoHV, a diluição também foi na base logarítmica 2, mas a partir da diluição 1:2 até 1:1024, utilizando-se meio MEM com 1% de antibióticos. Adicionou-se a quantidade de 50µl de 200 TCID50 da cepa Hbv-1 do BoHV-1 nas placas, que foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO2. Transcorrido o período, as placas receberam em cada cavidade 100 µL de suspensão de MDBK na concentração de 0,3 x 10^6 células/mL.

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 conseqüentemente 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).

c) Produção de IFN-gama pelos leucócitos sanguíneos mononucleares

O volume de 40 mL de sangue heparinizado foi delicadamente transferido em alíquotas 5mL, utilizando-se pipetas Pasteur estéreis, para tubos Falcon cônicos de 15 mL, sobre 5 mL de Ficoll-paque 1.077[14], para separação dos leucócitos mononucleares em gradiente de densidade. A mistura foi centrifugada a 440 G, durante 40 minutos a 4°C em centrifuga refrigerada "no break", permitindo a formação de um anel rico em células mononucleares (MN), na interface entre o plasma e os eritrócitos/granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo (Figura 19).

A camada de leucócitos mononucleares foi aspirada com o auxílio de pipeta Pasteur estéril e acondicionados em dois tubos Falcon de 15 mL, previamente adicionados de 5mL de meio de cultivo celular[15]. O volume final de cada tubo foi ajustado para 10 mL com meio de cultivo celular. Os tubos foram centrifugados a 282 G, durante 10 minutos, a 4°C. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, procedendo-se a lise de eritrócitos presentes nos botões celulares formados no fundo dos tubos, utilizando-se, para tanto, 2mL de NaCl a 0,2%, esperando-se vinte segundos. Após este tempo, 2mL de NaCl a 1,6% foi adicionado e as amostras foram, novamente centrifugadas, por 10 minutos, a 4°C e 282 G. As células foram lavadas duas vezes em PBS e o "pellet" de leucócitos mononucleares foi ressuspendido em um mL de meio de cultivo celular enriquecido (Anexo 1). A viabilidade dos leucócitos mononucleares foi feita pela prova de exclusão de azul de trypan. As concentrações celulares foram ajustadas para $5x10^6$/mL (Figura 19).

Posteriormente foram distribuídos 200 microlitros da suspensão celular contendo $1x10^6$ células, em placas de cultivo celular na fileira 2 poços A-E[16].

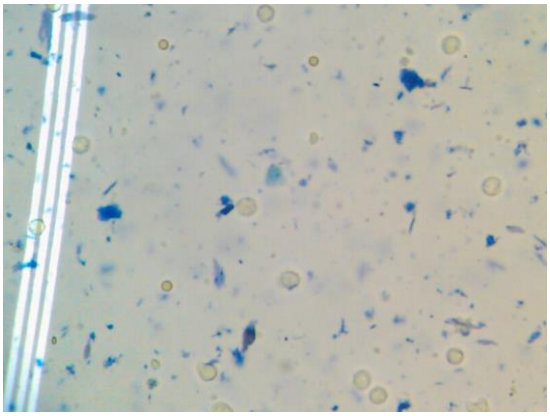
---

[14] Ficoll-paque PREMIUM 1.077, GE Healthcare Life Science
[15] RPMI 1640, Sigma
[16] Microteste 96 wells, Becton Dickinson Immunocytometry System®

Como estímulo celular foi adicionada 50µL de *concanavalin* A na concentração de 1µg/mL[17] (Anexo 2) nos poços da fileira 3, poços A-E (Quadro 14). As placas foram mantidas em estufa de CO_2 por três dias a 37°C.

Após o período de incubação, o conteúdo das placas foi aspirado, armazenados em microtubos e congelados a -80°C. A determinação da produção de IFN-gama foi realizada ao final das colheitas de sangue dos bezerros, por meio de teste imunoenzimático usando kits comerciais.

Figura 19 – (a) Camada de leucócitos mononucleares na interface entre o plasma e eritrócitos; (b) Leucócitos momonucleares viáveis obtidos pela separação por gradiente de densidade - São Paulo - 2013



(a) (b)

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

[17] Concanavalin A from Canavalia ensiformis (Jack bean), Sigma

Quadro 14 - Preenchimento da placa de cultivo celular para avaliação da produção de IFN-gama pelas células mononucleares do sangue dos bezerros dos grupos VAC (-) e VAC (+)

	1	2	3	4-12
A	**MEIO**	**Células**	**CONA**	
B	**MEIO**	**Células**	**CONA**	
C	**MEIO**	**Células**	**CONA**	
D	**MEIO**	**Células**	**CONA**	
E	**MEIO**	**Células**	**CONA**	
F				
G				
H				

Fonte: Baccili, C. C. (2013).
Legenda: MEIO: 250µL meio de cultivo celular suplementado; Células: 200µL suspensão celular + 50µL de meio de cultivo celular; CONA: Células: 200µL suspensão celular + 50µL de *concanavalin* A.

d) Determinação da concentração de IFN-gama

A mensuração da citocina IFN-gama do sobrenadante obtido a partir do cultivo celular foram feitas por meio de teste imunoenzimático, utilizando-se kit comercial[18] seguindo os protocolos determinados pelos fabricantes.

11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Os bezerros foram distribuídos em dois grupos compostos por bezerros não-vacinados (VAC -) e vacinados (VAC +) para o BVDV e BoHV-1.

Primeiramente, todas as variáveis em todos os tempos foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Com este teste, constatou-se que houve variáveis com distribuição normal e outras não, então optou-se por testes não paramétricos em todas as análises. Além disso, o baixo número de animais em cada grupo favoreceu o poder estatístico dos testes não paramétricos em todas as análises.

[18] AbD – Serotec Inerferon Gamma

Os valores relativos e absolutos dos tipos leucocitários e das subpopulações de linfócitos entre os grupos foram avaliados com o Teste U de Mann-Whitney.

Para avaliação da resposta imune basal, primária e secundária após a imunização dos bezerros, foi realizada a comparação dos resultados obtidos no dia da vacinação, aos 30 e 60 dias após a primovacinação em cada grupo estudado. A diferenças entre os momentos de avaliação foram obtidas pelo teste de Friedmann. A este último teste, quando apresentou, pelo menos um tempo significativamente diferente, foram realizadas as comparações múltiplas por meio do teste de Wilcoxom.

Todos os testes foram considerados significativos quando $P<0,05$.

12 RESULTADOS

12.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

a) Proporção de Linfócitos B CD21^{+}

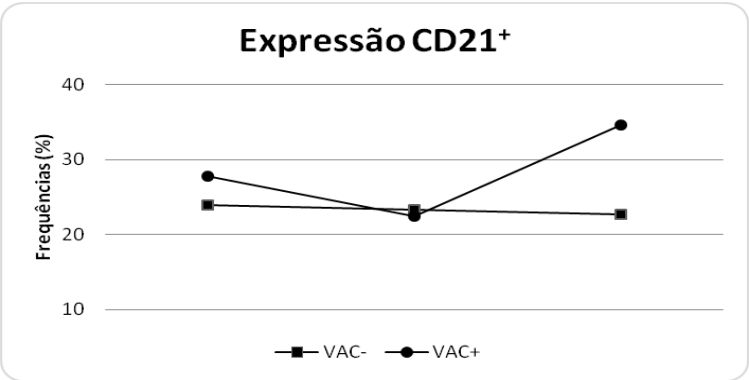
A proporção de células B CD21+ apresentaram maiores medianas no grupo VAC (+), especialmente no momento T2. No entanto, não foi possível comprovar diferença estatística entre os grupos nos tempos T0, T1 e T2(Tabela 10, Figura 20).

Tabela 10- Medianas das proporções de células B expressando o marcador CD21+ dentre os leucócitos mononucleares sanguíneos dos bezerros VAC (+) e VAC (-)

População de Linfócito B			
Tempos	**CD21+ (%)**		
	VAC-	**VAC+**	**Significâncias**
T0	24	28	0,56
T1	23	23	0,73
T2	23	35	0,63

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 20- Medianas das proporções de células B expressando o marcador CD21+ dentre os leucócitos mononucleares sanguíneos dos animais dos grupos VAC (+) e VAC (-) - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

b) Títulos de Anticorpos Neutralizantes ao BVDV e BoHV-1

Títulos de ACs neutralizantes para o BVDV não foi detectado no soro sanguíneo dos bezerros VAC (-) antes da primeira dose da vacina (T0) até os 60 dias após a primovacinação (T2), com exceção de 1/5 (20%) bezerros no T1. O grupo VAC + era composto por cinco animais soronegativos no momento T0, observando-se soroconversão de 2/5 (40%) no momento T1 e 3/5 (60%) no T2. (Tabela 11, Figura 21)

Para o BoHV-1 verificou-se baixos títulos de Acs neutralizantes no soro de 2/5 bezerros do grupo VAC (-) no T0 que mantiveram esses níveis até T2. No grupo de animais VAC (+), todos apresentaram resultados negativos na SN no momento T0. Em seguida, foi possível observar soroconverão em 2/5 (40%) no T1 e 5/5 (100%) no momento T2 (Tabela 11, Figuras 22).

Não foi possível observar diferenças entre as frequências de animais soropositivos e soronegativos entre os grupos de bezerros VAC- e VAC + para o BVDV e BoHV-1, nos momentos T0 até T2 (Tabela 10). em todo o período estudado. No entanto, no T2 foi possível observar P=0,083 no Teste do Qui-quadrado quando as frequências de animais soropositivos e soronegativos para o BoHV- 1 dos grupos VAC (+) e VAC(-) foram analisadas.

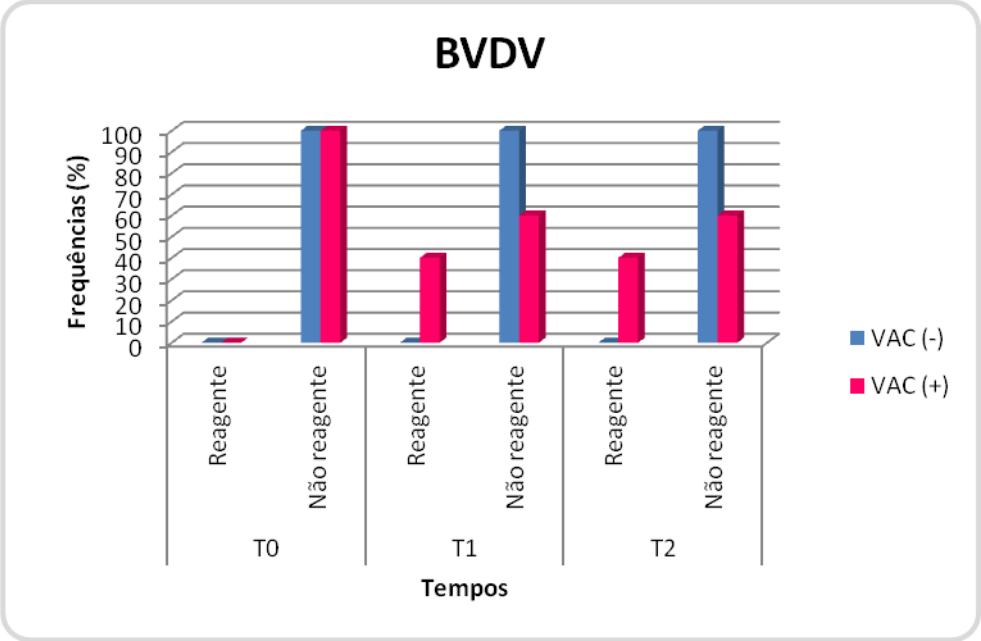
Tabela 11- Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos dos grupos VAC (-) e VAC (+) ao BVDV e BoHV-1 após imunização ativa nos momentos T0, T1 e T2

			VAC (-)		VAC (+)		
Agentes	**Tempos**	**Resultados**	**N**	**%**	**n**	**%**	**Significâncias**
BVDV	**T0**	+	0	0	0	0	NA
		-	5	100	5	100	
	T1	+	0	0	2	40	0,222
		-	5	100	3	60	
	T2	+	0	0	2	40	0,222
		-	5	100	3	60	
			VAC (-)		**VAC (+)**		
	Tempos	**Resultados**	**N**	**%**	**n**	**%**	**Significâncias**
BoHV-1	**T0**	+	2	40	0	0	0,222
		-	3	60	5	100	
	T1	+	2	40	2	40	0,738
		-	3	60	3	60	
	T2	+	2	40	5	100	0,083
		-	3	60	0	0	

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

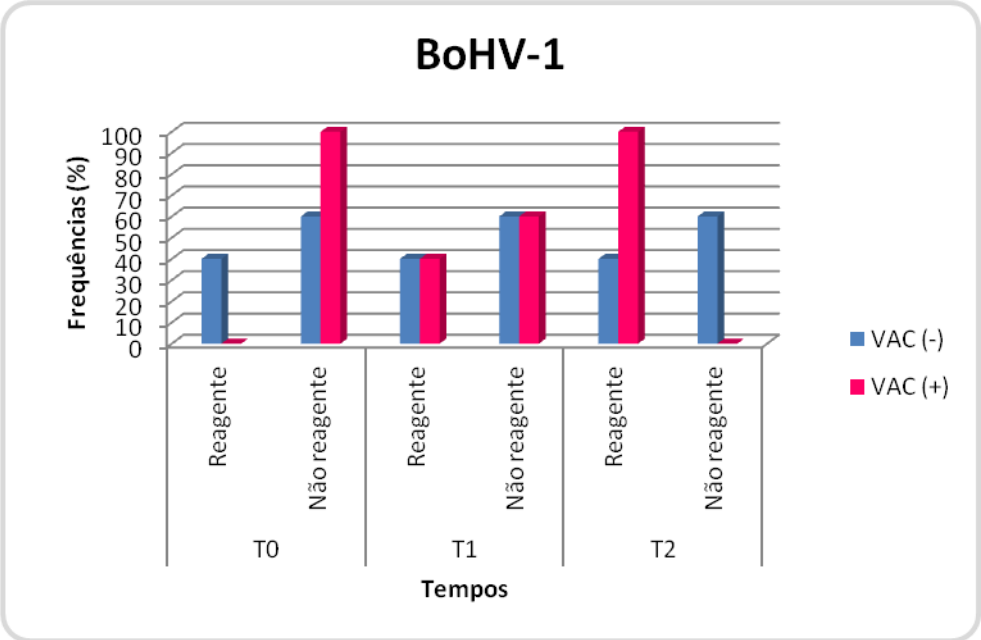
Legenda: (+): soropositivos; (-) soronegativos; NA: resultados obtidos constantes entre os grupos no qual todos os animais foram classificados como soronegativos

Figura 21- Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos dos grupos VAC (-) e VAC (+) ao BVDV após imunização ativa nos momentos T0, T1 e T2 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 22- Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos dos grupos VAC (-) e VAC (+) ao BoHV-1 após imunização ativa nos momentos T0, T1 e T2 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

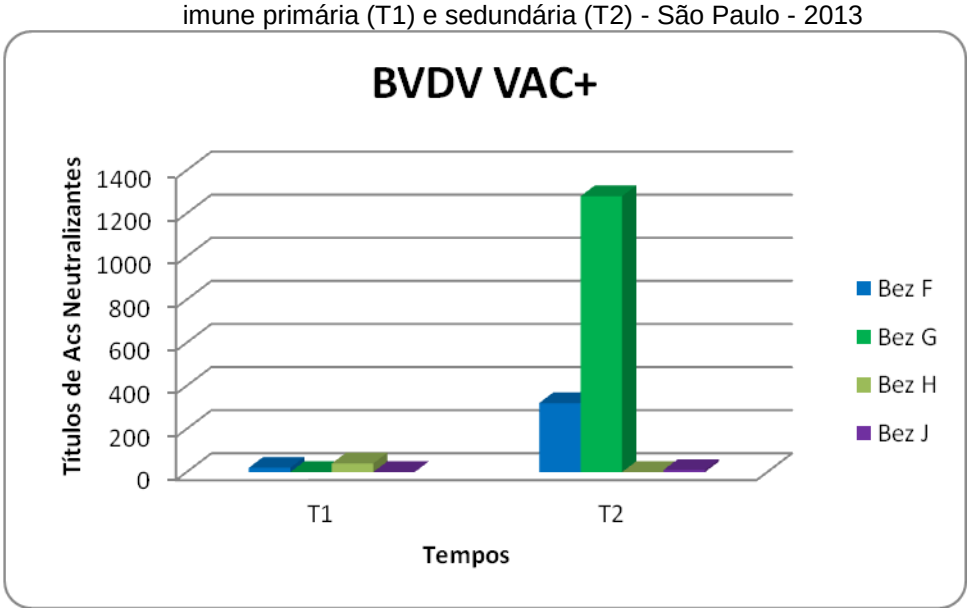
Os títulos de ACs neutralizantes séricos individuais para o BVDV e BoHV-1, obtidos antes da aplicação da vacina (T0), após resposta imune primária (T1) e secundária (T2) estão expressos na tabela 12, figuras 23 e 24.

Tabela 12 – Anticorpos neutralizantes ao BVDV e BoHV-1 no soro sanguíneo de bezerros não-vacinados (VAC -) e vacinados (VAC +) aos seis meses de idade

Grupos Experimentais	**Bezerros**	**BVDV**			**BoHV-1**		
		T0	**T1**	**T2**	**T0**	**T1**	**T2**
VAC (-)	20	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	16	16	4
	26	0	10	0	8	8	4
VAC (+)	12	0	20	320	0	1024	1024
	14	0	0	1280	0	8	1024
	17	0	40	0	0	0	1024
	18	0	0	0	0	0	1024
	23	0	0	10	0	0	128

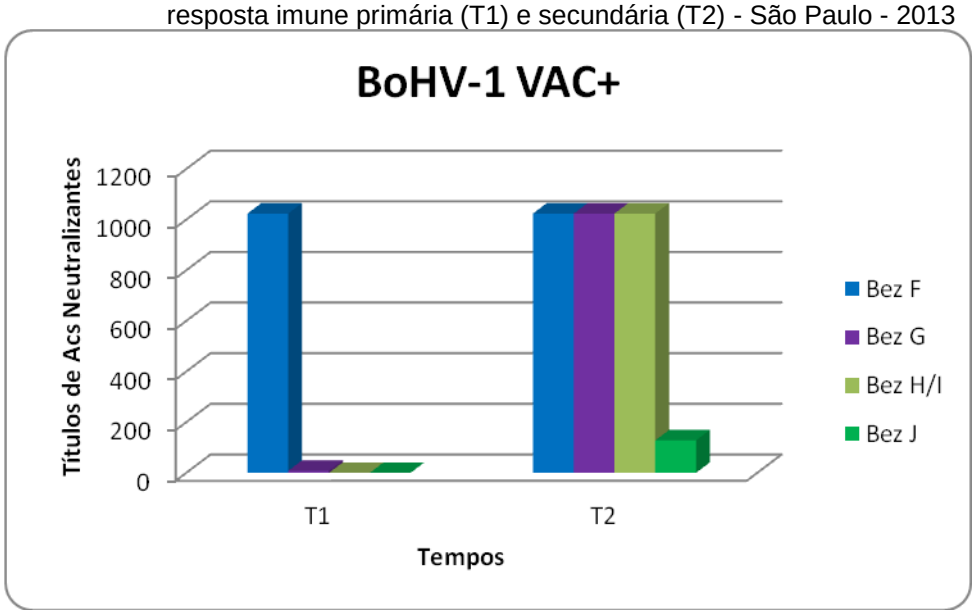
Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 23 – Títulos de anticorpos neutralizantes ao BVDV no soro sanguíneo dos bezerros vacinados (VAC +) que apresentaram títulos após resposta imune primária (T1) e sedundária (T2) - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 24 – Anticorpos neutralizantes ao BoHV-1 no soro sanguíneo de bezerros vacinados (VAC +) que apresentaram títulos circulantes após resposta imune primária (T1) e secundária (T2) - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Os títulos médios geométricos (GMT) obtidos para o BoHV-1 no VAC (-) para os momentos T0, T1 e T2 foram de 2,64; 2,64; e 1,74, respectivamente. Para o VAC (+) observaram-se GMTs igual a zero no T0; 6,06 no T1; e 675,59; respectivamente. Foi possível identificar diferença para o BoHV-1 entre os grupos apenas no T2 (P=0,006) (Tabela 13, Figura 25).

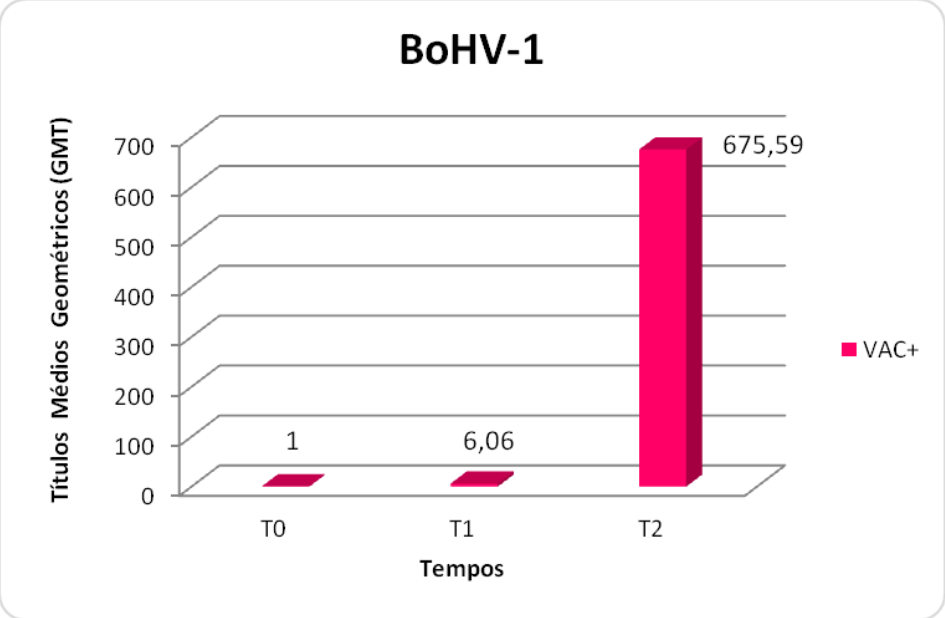
Não foram observadas diferenças entre os tempos T0, T1 e T2. No grupo composto por animais vacinados, observou-se diferenças entre os tempos (0,015). Esta diferença ocorreu entre os tempos T0 e T2 (P=0,034).

Tabela 13 – Log_2 títulos médios geométricos (GMT) e GMTs de Acs neutralizantes no soro de bezerros imunizados (VAC+) para o BoHV- 1 nos momentos T0, T1 e T2

Tempos	VAC (-)		VAC (+)		Significâncias
	log2 GMT	GMTs	log2 GMT	GMTs	
T0	1,4	2,63	0	1	0,136
T1	1,4	2,63	2,6	6,06	0,906
T2	0,8	1,74	9,4	675,59	0,006

Fonte: Baccili, C. C. (2013).

Figura 25- Títulos médios geométricos (GMT) de Acs neutralizantes no soro de bezerros imunizados (VAC+) para o BoHV- 1 nos momentos T0, T1 e T2 - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

12.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

a) Identificação das Proporções e Subpopulações dos Linfócitos T e Expressão do Marcador ($CD25^+$)

Os valores medianos relativos (%) da população de linfócitos T ($CD3^+$) estão dispostos na tabela 14 e figura 26. Observou-se maior proporção de células $CD3^+$ no grupo de animais vacinados (VAC+) em relação ao grupo de animais não imunizados nos tempos T1 e T2, porém, não foi possível comprovar diferenças estatísticas (P>0,05).

Os valores medianos relativos das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ do sangue dos bezerros também não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 14 e Figura 26). A expressão do receptor de IL- 2 ($CD25^+$) pelas subpopulações de linfócitos T $WC1^+$ foi maior no grupo de animais vacinados (VAC +), observando-se diferença estatística no momento T1 (P=0,0016).

Não houveram diferenças entre quaisquer dos momentos avaliados (T0, T1 e T2) em ambos os grupos para os valores medianos relativos das proporções de células B, linfócitos T e suas subpopulações.

Tabela 14- Medianas dos valores relativos (%) dos linfócitos T ($CD3^+$) e suas subpopulações no sangue de bezerros não imunizados (VAC-) e imunizados (VAC+) nos tempos T0, T1 e T2

População e Subpopulações de Linfócitos T												
Ts	**$CD3^+$ (%)**			**$CD4^+$ (%)**			**$CD8^+$ (%)**			**$WC1^+$ (%)**		
	VAC-	**VAC+**	**P**	**VAC-**	**VAC+**	**P**	**VAC-**	**VAC+**	**P**	**VAC-**	**VAC+**	**P**
T0	53	53	0,84	27	22	0,31	20	11	0,19	30	38	0,90
T1	47	55	0,69	31	29	0,73	19	15	0,41	35	39	0,69
T2	44	48	0,84	32	24	0,31	12	17	0,90	39	20	0,19

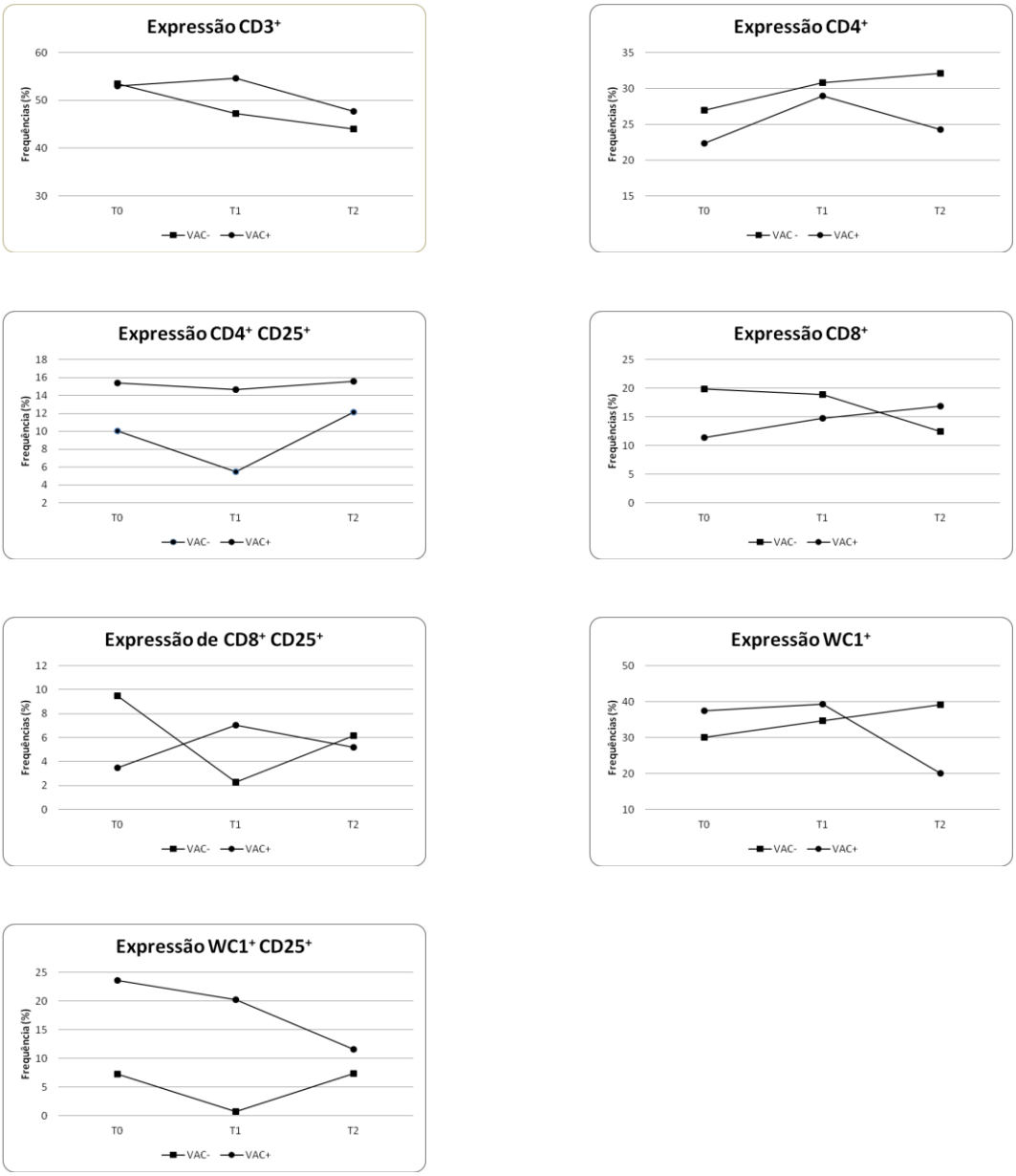
Fonte: Baccili, C. C. (2013).
Legenda: Ts: tempos; P: significâncias

Tabela 15 – Medianas dos valores relativos (%) das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ do sangue de bezerros não imunizados (VAC-) e bezerros imunizados (VAC+) após resposta imune primária (T1) e secundária (T2)

Expressão de $CD25^+$ nassubpopulções de linfócitos T									
Tempos	**CD4+CD25+ (%)**			**CD8+CD25+ (%)**			**WC1+CD25+ (%)**		
	VAC-	**VAC+**	**P**	**VAC-**	**VAC+**	**P**	**VAC-**	**VAC+**	**P**
T0	10	15	0,55	9	4	0,19	7	24	0,29
T1	5	15	0,09	2	7	0,19	1	20	0,02
T2	12	16	0,31	6	5	0,90	7	12	0,41

Fonte: Baccili, C. C. (2013).
Legenda: P: significâncias

Figura 26- Medianas dos valores relativos (%) de linfócitos T ($CD3^+$) e suas subpopulações $CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$ com expressão de $CD25^+$ do sangue de bezerros não imunizados (VAC-) e bezerros imunizados (VAC+) após resposta imune primária (T1) e secundária (T2) - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili, C. C. (2013).

b) Produção de IFN-gama pelos leucócitos sanguíneos mononucleares

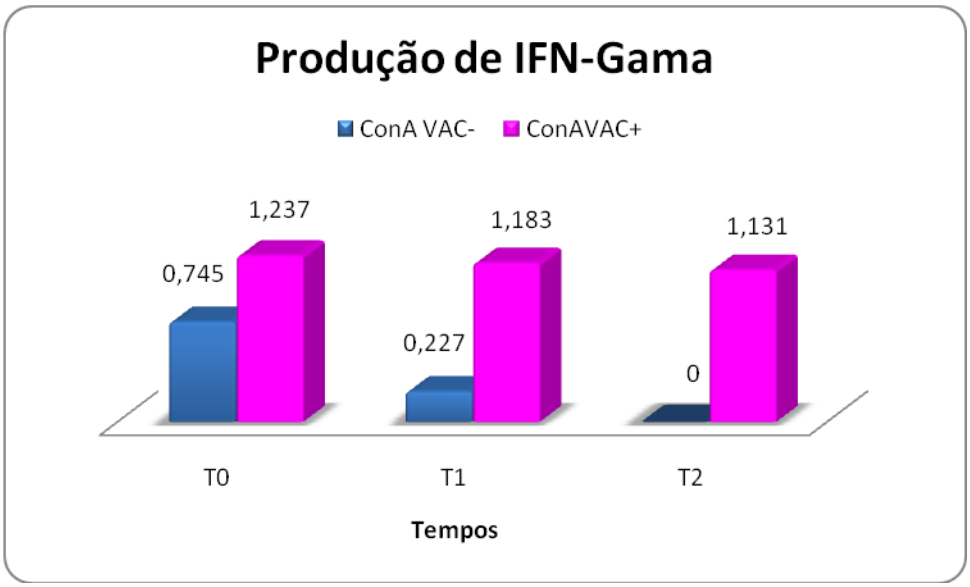
Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a concentração de citocinas produzidas pelas células mononucleares sanguíneas dos bezerros mantidas em cultivo celular por três dias (Tabela 16 e Figura 27).

Tabela 16- Concentrações de IFN-gama (ng/mL) no sobrenadante do cultivo celular dos bezerros dos grupos experimentais VAC (+) e VAC (-) por liberação espontânea e estimuladas com ConA -

Tempos	Células		P	Concanavalina A		P
	VAC-	VAC+		VAC-	VAC+	
T0	0,552	0,122	0,2	0,745	1,237	0,6
T1	0	0	0,9	0,227	1,183	0,5
T2	0	0	0,6	0	1,131	0,1

Fonte: Baccili, C. C. (2013)
Legenda: P: significância.

Figura 27- Concentrações de IFN-gama (ng/mL) no sobrenadante do cultivo celular dos bezerros dos grupos experimentais VAC (+) e VAC (-) por liberação espontânea e estimuladas com ConA - São Paulo - 2013



Fonte: Baccili. C. C. (2013).

13 DISCUSSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa foi possível verificar que a vacinação dos bezerros estimulou resposta imune humoral verificada pela soroconversão dos bezerros e títulos de ACs apresentados, especialmente ao BoHV-1. Além disso, foi possível verificar maior ativação das células T auxiliares e gama-delta sanguíneas pela sua maior expressão de $CD25^{+}$. Além disso, os bezerros vacinados apresentaram tendência para maior produção de interferon-gama pelas células mononucleares do sangue.

a.) Avaliação da Resposta Imune Humoral

Alguns bezerros deste estudo apresentaram baixos títulos de ACs circulantes ao BoHV-1 antes da aplicação da vacina, provavelmente estas imunoglobulinas foram adquiridas pela ingestão de colostro materno e persistiram na circulação sanguínea de alguns dos bezerros avaliados até os seis meses de idade. Este fato já foi relatado por alguns pesquisadores como Menanteau-Horta et al. (1985), Hubner et al. (1996), Gatti et al. (2010).

A garantia da origem dos ACs detectados antes da imunização dos animais pode ser atribuída ao acompanhamento de mães soronegativas desde sua triagem até a parição, no grupo de mães não-vacinadas; da soronegatividade dos bezerros antes da mamada do colostro; do isolamento dos bezerros do nascimento até o início desse experimento quando completaram seis meses de idade.

Bezerros com 180 dias de vida não apresentaram ACs para o BVDV e os títulos para o BoHV-1 antes da imunização eram baixos e inferiores a 32 que são títulos protetores recomendados pela literatura 32 (BOLIN; RIDPATH, 1995). É válido ressaltar que esta fase é crucial para a sobrevida dos bezerros, pois baixos títulos de ACs colostrais atuam como um fator de risco para o desenvolvimento da forma grave da BVDV e BoHV-1, além disso, a imunossupressão do período culmina com a instalação de infecções secundárias (LINDBERG, 2003; MECHOR et al., 1987).

A taxa de soroconversão para o BVDV foi de 40% após o desenvolvimento da resposta primária e 60% após a resposta imune secundária à vacinação; para o BoHV- 1 a frequência após a 1°dose da vacina foi semelhante ao BVDV, no entanto foi de 100% após o desenvolvimento da RI secundária. A resposta imune primária geralmente é lenta e fraca, porém, a segunda dose do antígeno irá encontrar grande número de linfócitos B de memória e a resposta será mais intensa e duradoura. Além disso, observa-se predomínio de IgG na resposta secundária, imunoglobulina esta que possui maior atividade neutralizante, quando comparada à IgM, produzida nas respostas primárias (TIZARD, 2008). Assim, a técnica de SN possui maior capacidade para detectar ACs neutralizantes após a resposta imune secundária.

Os bezerros H/J apresentaram baixos títulos de ACs neutralizantes para o BVDV após a 1°e 2°dose da vacina, respectivamente. Além disso, outro animal não apresentou ACs para o BVDV em todo o período de estudo, fato provavelmente relacionado ao seu *status* de maturação imunológica (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Platt et al. (2008) utilizaram vacina comercializada nos Estados Unidos, contendo as mesmas cepas das vacinas usadas nesta pesquisa, diluídas no adjuvante contendo “Quil A, colesterol e amphigen”. No entanto, no trabalho citado foram selecionados bovinos de corte com aproximadamente 350-400kg de peso vivo, o que nos leva a crer que este animais já estavam ao menos na puberdade, período onde o amadurecimento imunológico dos bovinos já foi concluído. Estes autores verificaram maiores valores logarítmicos de ACs neutralizantes para o BVDV-1 e BVDV- 2 no grupo de animais vacinados. Em nossa pesquisa optamos pela análise qualitativa dos títulos de ACs para o BVDV, visto que alguns animais não responderam à vacinação, no entanto, as diferenças entre as frequências obtidas entre os grupos vacinados e não-vacinados não foram encontradas. Por outro lado, 2/5 dos animais do grupo vacinado que apresentaram produção de ACs neutralizantes possuíam títulos acima da média de 512 observada por Platt et al. (2008).

A resposta humoral específica ao BoHV-1 foi maior em relação ao BVDV, considerando a frequência de soroconversão e os títulos de ACs neutralizantes obtidos. Este fato pode ser atribuído à composição da vacina

comercial que possuía cepa atenuada para o BoHV- 1, que possui maior intensidade e duração da resposta (KELLING, 2004; CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004).

A proporção de células B $CD21^+$ encontrada foi de 24,8% considerando-se as 30 análises de citometria de fluxo realizadas nesta pesquisa. Este valor é um pouco inferior à média de 30% encontrada por Kampen et al. (2006).

As proporções de células B $CD21^+$ não diferiram estatisticamente nos bezerros vacinados e não vacinados. No entanto, observou-se tendência no aumento na porcentagem destas células após resposta imune secundária no grupo de bezerros vacinados. O pequeno número de animais incluídos nos grupos experimentais foi uma limitação para a comprovação das diferenças estatísticas entre os grupos de bezerros VAC (+) e VAC (-).

b.) Avaliação da Resposta Imune Celular

Nesta pesquisa foi adotado modelo para avaliação da resposta imune mediada por células induzida pela vacinação, adaptado de Quade & Roth (1999) e Endsley et al. (2002).

A resposta imune mediada por células específicas para o BVDV ou BoHV-1 dependem da estimulação *in vitro* com esses agentes e a disponibilidade do vírus para a realização dos ensaios. Desta forma, as células mononucleares do sangue foram cultivadas e estimuladas com concanavalina A para a indução da mitose e mensuração do interferon-gama produzido. Além disso, a marcação do $CD25^+$ foi feita nos linfócitos sanguíneos e não nas células obtidas a partir de cultivo celular estímuladas *in vitro* com o vírus. Assim, nosso estudo não pôde garantir resposta específica ao BVDV e BoHV-1, que limita a especificidade destas provas para a avaliação da resposta vacinal. Ou seja, desafios ambientais podem ter influenciado na nossa resposta.

Os valores médios obtidos nas 30 análises de citometria realizadas revelaram proporções de linfócitos T ($CD3^+$) equivalente a 47,59%; 27,81% para o $CD4^+$; 17,74 para $CD8^+$; e 33,18% para células gama-delta $WC1^+$. A proporção de células T auxiliares foi semelhante à media de 29% para $CD4^+$

encontrada por Wilson et al. (1996), no entanto, observou-se maiores valores para $CD8^+$ e gama-delta $WC1^+$. Kampen et al. (2006) obtiveram valores de 20% para linfócitos T auxiliares ($CD4^+$), 9% para $CD8^+$ e 20% para $WC1^+$, resultados inferiores aos observados nesta pesquisa. É válido ressaltar que a faixa etária estudada pelos autores citados foi de 180 dias e nossos resultados referem-se ao período de 180 a 240 dias.

Observamos tendência para maiores proporções de linfócitos T ($CD3^+$) do sangue de bezerros vacinados, porém suas subpopulações não oscilaram com a resposta vacinal. A marcação de células T sanguíneas parece não ser um bom parâmetro para avaliação da resposta vacinal, pois muitos fatores ambientais incluindo situações de estresse podem ocasionar variações nessas populações celulares.

As proporções de células T gama-delta $WC1^+$ e $CD4^+$ expressando o marcador $CD25^+$ foram maiores no grupo de animais vacinados desde o início do experimento aos 180 dias de idade, porém apenas observou-se diferença estatística entre os grupos após resposta imune primária (T1). Talvez resposta imune aos patógenos presentes no meio ambiente podem ter contribuído para estes resultados.

Os valores medianos para a produção de IFN-gamma foi semelhante entre os dois grupos de animais não-vacinados e vacinados.

Trabalho de Platt et al. (2008) e Platt et al. (2009) estimularam linfócitos do sangue periférico *in vitro* com o BVDV-1, BVDV-2, BoHV-1, vírus respiratório sincicial bovino, em seguida, avaliaram a proporção de $CD25^+$ expresso nas subpopulações dos linfócitos sanguíneos. Para excluir outros estímulos externos além dos agentes incluídos nas culturas, os autores consideraram apenas as diferenças obtidas pela subtração da porcentagem de $CD25^+$ presentes nas células estimuladas com os patógenos específicos em relação à expressão desse marcador pelas células controle não estimuladas. Este trabalho representa mais um passo para o delineamento de pesquisas futuras que buscam especificidade na resposta mediada por células a patógenos.

O grupo de animais vacinados apresentou uma maior resposta celular durante o período de realização deste estudo, porém outros desafios ambientais devem ter influenciado nessa reposta.

14 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

a) A vacinação dos bezerros aos seis meses de idade estimulou a resposta imune humoral para o BoHV-1;

b) A resposta humoral estimulada por vacina inativada com BVDV apresentou resposta parcial, considerando-se que alguns animais não responderam a vacinação;

c) A resposta imune mediada por células foi maior no grupo de animais vacinados pela maior proporção de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) e gama-delta ($WC1^+$). Porém, as provas de avaliação celular utilizadas não foram capazes de detectar respostas exclusivas à exposição aos antígenos vacinais.

15 CONSIDERAÇÔES GERAIS

A interface imunidade passiva *versus* imunidade ativa é um tema complexo que depende de características específicas das propriedades, relacionadas principalmente ao manejo e à qualidade do colostro oferecido, assim como os desafios antigênicos encontrados pelos bezerros. Nas condições em que foi desenvolvida esta pesquisa, considerando-se as duas etapas experimentais realizadas, pode-se concluir que:

(a) Mães soronegativas para o BVDV e BoHV-1 não transferem ACs contra estes vírus aos seus recém-nascidos e devem ser vacinadas no período pré-parto;

(b) Os componentes maternos protegem bezerros até os três meses de vida, desta forma, vaciná-los apenas aos seis meses de idade representa um risco de ocorrência de infecção por BVDV e BoHV-1;

(c) A primo-vacinação dos bezerros, considerando-se a proteção materna, deve ser realizada aos três meses de idade, recordando que a imunização anterior a este período os anticorpos maternos bloqueiam a imunidade ativa dos recém-nascidos;

(d) Bezerros vacinados aos seis meses de idade desenvolvem imunidade humoral e celular, especialmente para o BoHV-1;

(e) Bezerros vacinados aos seis meses de idade apresentam resposta parcial à vacinação para o BVDV por imaturidade imunológica ou devido à composição antigênica da vacina empregada.

REFERÊNCIAS

BABIUK, S.; BACA-ESTRADA, M. E.; FOLDVARI, M.; MIDDLETON, D. M.; RABUSSAY, D.; WIDERA, G., BABIUK, L. A. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. **Journal of Biotechnology**. v. 110, p. 1-10, 2004.

BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 3. p. 463-476, 2001.

BENESI; F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA, R. M. S.; SHECAIRA, C. L.; GOMES, V. Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 4, p. 352-356. 2012

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

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.42, p.133-147, 2002.

BRASIL. Coordenação de fiscalização de produtos veterinários. Relatório de produtos com licença Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RPRODVIG-2013-05-20.pdf >. Acesso em: 07 Set 2013.

BRUN-HANSEN, H.C.,KAMPEN, A, H; LUND, A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Clinical Pathology ,**v. 35, n. 2, p. 182-7, 2006.

BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo virus da diarreia viral bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 7-19, 2010.

BRUSCHKE, C. J.; HAGHPARAST, A.; HOEK, A.; RUTTEN, V. P.; WENTINK, G. H.; VAN RIJN, P. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semihomologous cytopathic BVDV. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. 37-50, 1998.

CHASE, C. C. L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 20, p. 95-114, 2004.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, p 87–104, 2008.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. Frequência de anticorpos e fatores de risco pera a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovina leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1448-1451, 2010.

CORTESE, V. S. Neonatal Immunology **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.25, p. 221-227, 2009.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; ARCARO JÚNIOR, I; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; DE STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; VASCONCELLOS, S. A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 161-168, 2003.

DONOVAN, D. C.; REBER, A. J.; GABBARD, J. D.; ACEVES-AVILA, M.; GALLAND, K. L.; HOLBERT, K. A.; ELY, L. O.; HURLEY, D. J. Effect of maternal cells transferred with colostrums on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 07, p. 778-782, 2007.

DRISKELL, E. A.; RIDPATH, J. F. Survey of bovine viral diarrhea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2000 a 2005. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 600-605, 2006.

ELFSTRAND, L.; MANSSON, H.L.; PAULSSON M.; NYBERG, L., AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing. **International Dairy Journal**, n.12, p. 879-887, 2002.

ELLIS, J.; WEST, K.; CORTESE, V.; KONOBY, C.; WEIGEL, D. Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhea virus type II in young calves. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 3, p. 351-356, 2001.

ENDSLEY, J. J.; QUADE, M. J.; TERHAAR, B.; ROTH, J. A. BHV-1–Specific CD41, CD81, and gd T Cells in Calves Vaccinated with One Dose of a Modified Live BHV-1 Vaccine. **Viral Immunology**, v. 15, n. 2, 2002.

ENDSLEY, J. J.; ROTH, J. A.; RIDPATH, J.; NEILL, J. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. **Biologicals**, v. 31, p. 123–125, 2003.

ENDSLEY, J. J.; RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; SANDBULTE, M. R.; ROTH, J. A. Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhea virus in calves with maternal antibodies. **Viral Immunology**, v. 17, p. 13-23, 2004.

FAGLIARI, J. J.; OLIVEIRA; E.C.; PEGORER, M. F.; FERRANTE JÚNIOR, L. C.; CAMPOS FILHO, E. Relação entre o nível sérico de gamaglobulinas e as atividades de gamaglutamiltransferase, fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase de bezerros recém-nascidos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 48, n. 2, p. :225-232, 1996.

FEITOSA, F. L. F.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; BOVINO, F.; LISBOA, J. A. N.; PERRI, S. H. V.; GASPARELLI, E. R. F.Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 696-704, 2010.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; FLORES VOGEL, F. S.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina no Brasil – histórico situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 25, n. 03, p. 125-134, 2005.

FRANKEN P. BHV-1 eradication: costs and benefits, the Dutch experience. In: **Proc Symposium BoHV-1 Eradication,** Berlin:Germany, May 29-30. p. 13, 2006.

FULTON, R. W.; BRIGGS, R. E.; PAYTON, M. E.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J.; DUFF, G. C. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination, **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 643-649, 2004.

GATTI, S. P. ; AFFONSO, I. B.; DIAS, F. C.; MEDEIROS, A. S. R.; FERREIRA, F.; SAMARA, S. I. Títulos de anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de bezerras em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 26, n. 3, p. 147-152, 2010.

GILLESPIE, J.; BAKER, J.; McENTEE, K. A cytopathogenic strains of virus diarrhea virus. **The Cornell veterinarian**, v. 50, p. 73-79, 1960.

GOMES, V. **Componentes imunológicos do colostro bovino: células, teores de imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET)**, 2008. 102 fl .Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOMES, V; MADUREIRA, K. M; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ALVES, M.; BAPTISTELLA, F.; BENESI, F. J. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p.1047-1053, 2011.

GUZMAN, E.; PRICE, S.; POULSOM, H.; HOPE, J. Bovine γδ t cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. **Veterinary Immunololy Immunopathology**, v. 148, p. 161-167, 2011.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine vírus diarrhea vírus infections. **Veterinary Microbiology**., v. 64, p. 89-107, 1999.

HUBNER, S. de O.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M. da; MORAES, M. P. Evolução da imunidade passiva contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 435-439, 1996.

KAMPEN, A. H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T.; STORSET, A. K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1-2, p. 53-63, 2006.

KELLING, C. L. Evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 20, p. 115-129, 2004.

LEMAIRE, M.; WEYNANTS, V.; GODFROID, J.; SCHYNTS, F.; MEYER, G.; LETESSON, J. J.; THIRY, E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, n. 5, p. 1885-1894, 2000.

LEVINGS, R. L.; ROTH, J. A. Immunity to bovine herpesvirus 1: II. Adaptive immunity and vaccinology**. Animal Health Research Reviews**, v. 14, n. 1, p. 103–123, 2013.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIEDEL-CASPARI, G.; POHLENZ, J. F. Uptake of colostral leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, p. 33-40, 2002.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIDPATH; NEILL, 2003

LIMA M.L., FLORES E.F., WEIBLEN R., VOGEL F.S.F. e ARENHART S. Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**., v. 24, p. 35-42, 2004.

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

LINDBERG, A.; GROENENDAAL, H.; ALENIUS, S.; EMANUELSON, U. Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral-diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 51, n. 3–4, p. 199–214, 2001.

LINDBERG 2003 LINDBERG, A.L. Bovine viral diarrhea virus infections and its control: A review. **Veterinary Quarterly***,* v.25, p.1-16, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670010>. Acesso em: jul. 2011.

LINDENBACH, B. D.; PRÁGAI, B. M.; MONTSERRET, BERAN, R. K. F.; PYLE, A. M.; PENIN, F.; RICE, C. M. The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. **Journal of Virology**, p. 8905–8918, 2007.

LONERAGAN, G.H.; THOMSON, D.U.; MONTGOMERY, D.L.; MASON, G. L.; LARSON, R. L. Prevalence, outcome and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea vírus in feedlot cattle. **Journal of the American Medical Association**, v. 226, p. 595-601, 2005.

MADUREIRA, K. M. **Citocinas IL-1beta, IL-6, TNF-alfa e IFN-gama no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva**, 2012.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MECHOR, G. D.; ROUSSEAUX, C. G.; RADOSTITS, O. M., BABIUK, L. A.;PETRIE, L. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 452-459, 1987.

MENANTEAU-HORTA, A. M.; AMES, T. R.; JOHNSON, D. W.; Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea vaccines. **Canadian Journal Compendium Medical**, v. 49, p. 10-14, 1985.

MOELLER JR., R. B.; ADASKA, J.; REYNOLDS, J.; BLANCHARD, P. C. Systemic bovine herpesvirus 1 infections in neonatal dairy calves. **Journal of Veterinary of Diagnostic Investigation**, v. 25, n.1, p.136-41, 2013.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 207-219, 2002.

MOREIRA, S. B. G.; SAMARA, S. I.; ARITA, G. M. M.; FERREIRA, F.; PEREIRA, G. T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da

rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 127-130, 2001.

NOBIRON, I.; THOMPSON, I.; BROWNLIE, J.; COLLINS, M. E. DNA vaccination against bovine viral diarrhea vírus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. **Vaccine**, v. 21, p. 2082-92, 2003.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES – World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2008. Disponível em <http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.08.%20Diarrea%20viral%20bovina.pdf>. Updated 07/12/2010. Acesso em: 07 Dez 2010.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES – World Organisation for Animal Health. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis, 2010. OIE In: **Terrestrial Manual 2010**, cap. 2.4.13, Office Interbational des epizooties, Paris.

OHTSUKA, H.; TERASAWA, S.; WATANABE, C.; KOHIRUIMAKI, M., MUKAI, M., ANDO, T.; PETROVSKI, K.R.; MORRIS, S. Effect of parity on lymphocytes in peripheral blood and colostrum of healthy Holstein dairy cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 130-135, 2010.

PLATT, R.; COUTU, C.; MEINERT, T.; ROTH, J. A. Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, p. 8 – 15, 2008.

PLATT, R.; WIDEL, P. W.; KESL, L. D.; ROTH, J. A. Comparasion of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. **Vaccine**, v. 27, p. 4508-4519, 2009.

POSPÍSIL, Z.; KREJCÍ, J.; JÍNEK, P.; LÁNY, P.; ZENDULKOVÁ, D.; CÍHAL, P. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**. v. 53, n.12, p. 199-206, 1996.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HUBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo virus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina**, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

QUADE, M. J.; ROTH, J. A. Antigen specific in vitro activation of T lymphocyte subsets of cattle immunized with a modified-live bovine herpesvirus-1 vaccine. **Viral Immunology**. v. 12, p. 9–21, 1999.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. MASTITIS. In: **Veterinary Medicine. A Textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.** 10th ed. Londn, Baillière Tindall. 2007.

REBER, A. J.; LOCKWOOD, A.; HIPPEN, A. R.; HURLEY, D. J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a pheripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 139-150, 2006.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of neonatal immune system: I- effects on monocyte lineage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p.186-196, 2008a.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of neonatal immune system: II- Effects on neonatal lymhocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p.305-313, 2008b.

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.; NEIL, J. D.; ENDSLEY, J.; ROTH, J. A. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 64, n. 1, p. 65-69, 2003.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 105-121, 2010.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotypes: detection of a large genomic insertion in a nonpathogenic BVDV. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 39-46, 1995.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. Virology Division News. **Archives of Virology***,* v.123, p.425-449, 1992.

ROIZMANN, B.; PELLETT, P. E. The family Herpesviridae: A brief introduction In: KNIPE, M. D.; HOWLEY, P. M. **Field's Virology**. 5.th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: editora, p. 2480-2497. 2007.

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 cobaios. 2006, 35f.Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SILVA, M. C. O. P. **Soroprevalência do herpesvírus bovino tipo 1 e 5 no estado de São Paulo, Brasil.** 2011. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo, 2011.

THIEL, H. J.; PLAGEMANN, P. G. W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.) **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven Co., p. 1059-1074, 1996.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2. ed. Roca: São Paulo, 556 p, 2004.

VASCONCELLOS, G. S. F. M; BACCILI, C. C.; SILVA, C. P. C.; POZZI, C. R.; GOMES, V. Anticorpos vacinais para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpes vírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no soro sanguíneo e colostro de vacas holandesas In: X Congresso Brasileiro de Buiatria. **Anais:...** Belém, PA, 2013.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WELBLEN, R.; MAYER, S. V.; QUADROS, V. L. de Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.83-89, 2002.

WILSON, R.A.; ZOLNAI, A.; RUDAS, P.; FRENYO, L.V. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 53, n. 1-2, p. 49-60, 1996.

YAMANAKA, H.; KATAGIRI, Y.; DOMI, M.; HAGIWARA, K.; IWAI, H. Effect of Interleukin-1 receprot antagonist on Concanavalin A response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.8, p.933-935, 2001.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. **Microbiology and Immunology,** v. 47, n. 6, p. 461-468, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1

Solução de RPMI (suplementado) para 500 mL

2 mM L Glutamina.....0,146g
10% soro fetal bovino.....50mL
60µg/mL Penicilina.....3mL
20 mM HEPE.....4,86mL

ANEXO 2

Solução de Concanavalina A para 5 mL

500 µg *Concanavalin A*.....0,0005g
PBS estéril.....5 mL