HELOISA GODOI BERTAGNON

**Avaliação da resposta imune inata respiratória em
bezerros saudáveis durante o segundo trimestre de vida**

São Paulo
2015

HELOISA GODOI BERTAGNON

**Avaliação da resposta imune inata respiratória em
bezerros saudáveis durante o segundo trimestre de vida**

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

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Prof^ª Dr^ª Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo
2015

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.3074
FMVZ

Bertagnon, Heloisa Godoi

Avaliação da resposta imune inata respiratória em bezerros sadios durante o segundo trimestre de vida / Heloisa Godoi Bertagnon. -- 2015.
101 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Bovinos. 2. Fagocitose. 3. Metabolismo oxidativo. 4. Macrófago alveolar. 5. Th1.
6. Imunoglobulinas. 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 "Avaliação da resposta imune inata respiratória em bezerros sadios", protocolado sob o nº 2224/2011, utilizando 10 (dez) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Avaliation of innate immune response respiratory from healthy calves", protocol number 2224/2011, utilizing 10 (ten) cattle, under the responsibility Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BERTAGNON, Heloisa Godoi

Título: Avaliação da resposta imune inata respiratória em bezerros sadios durante o segundo trimestre de vida

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*À Gabi, motivo da minha luta diária, que me dizia após um dia
comprido de trabalho “Mamãe que cheiro de vaquinha, vamos
brincar?” e lá ia eu para o terceiro turno do dia, o mais criativo, o
de mãe...*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu e da coragem para enfrentar os desafios, alguns superados, outros que serviram para reflexão.

A minha família pelo apoio incondicional e por participarem comigo de momentos alegres e difíceis, tornando esse caminho da vida menos árduo. Meu pai, José Ricardo por seus conselhos e correção da tese. A minha mãe Vânia Maria pelo apoio e cuidados com a Gabi para que eu pudesse trabalhar tantas e tantas vezes, ao meu irmão Pedro Augusto por me escutar nos momentos difíceis e a minha filha Gabi, que mesmo tão pequeninha auxiliou no trato dos bezerros no laboratório. Ao meu namorado Eduardo Henrique pelos auxílios na redação da tese e por aguentar meus momentos de ansiedade.

A Prof Alice, muito mais que orientadora científica. Profissional incrível, que nos inspira a tornarmos profissionais melhores. Orientadora dedicada, exigente, amiga, mãe, conselheira, poderosa do Nilo e que faz uma mousse de rapadura inenarrável.

A minha equipe atual, Camila Freitas Batista, Renata Caminha Gomes, Kamila Reis dos Santos, Alice Maria Melville Paiva Della Libera, pelos inúmeros momentos passados, pela cumplicidade, pelos desafios superados e tropeços contornados. Meninas de personalidade forte, inteligentes e amáveis que só somaram em minha vida.

A minha equipe “flutuante” Maiara Blagitz, Jessyca Beraldi Bellinazzi, Maria Gabriela Barbosa Lima, Bruna Parapinski dos Santos, Fernando Nogueira de Souza, Andrea Parra, Gian, Mailson, e Rodrigo que quando não estavam presentes em pessoa, estavam em pensamento, contribuindo para execução do projeto tanto na parte científica como na criativa.

Aos IC, que por aqui passaram e continuam passando, imprimido seu jeito de trabalho, de atrapalhadas e construção de conhecimento: Jessica Reple, Andrew Rodolfo, Nicholas, Raphael, Gabriel e Daniel.

Aos colegas de pós graduação e residentes, pelos bons momentos de descontração.

A inestimável ajuda das técnicas e funcionárias de laboratório, Claudia, Samantha, Clara, Maria Helena, Marli, Mau, Dinha que foram muito requisitadas e aguentaram com bom humor os “maus” momentos laboratoriais.

Aos professores do departamento de clinica, médica, pelos conhecimentos compartilhados.

A Paula Papa e equipe (Renata, Gabriela, Antenor, Danila, Luciana) pelos ensinamentos da “bendita” técnica de PCR.

Aos funcionários da biblioteca que foram sempre prestativo, principalmente na etapa final desta dissertação.

A Fapesp- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, e ao CNPQ que possibilitaram a execução deste projeto e a UNICENTRO os docentes da veterinária que permitiram meu afastamento para capacitação, assumindo meus afazeres.

RESUMO

BERTAGNON, H. G. **Avaliação da resposta imune inata respiratória em bezerros sadios durante o segundo trimestre de vida.** [Evaluation of respiratory innate immune response in healthy calves during the second trimester]. 2015. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A idade entre o terceiro e o sexto mês de vida é um período peculiar para o estabelecimento da imunidade própria dos bezerros. Nesse intervalo, há susceptibilidade e índice de letalidade à broncopneumonias maiores, provavelmente devido à imaturidade do sistema imunológico pulmonar, quer seja por uma insuficiente resposta, nos primeiros momentos, quer seja por uma resposta citotóxica exagerada, no momento subsequente. A par disso, este trabalho teve o intuito de verificar o momento em que ocorre a maturidade do sistema imunológico, como se comportam os perfis Th1 e Th2 e a existência de uma resposta citotóxica exagerada, durante esta fase de estabelecimento da imunidade ativa dos bezerros. Para tal, estudaram-se as funções de fagocitose e metabolismo oxidativo de leucócitos sanguíneos e broncoalveolares, as classes de imunoglobulinas e citocinas incriminadas nos padrões de resposta linfocitária Th1 e Th2, em 10 bezerros da raça holandesa, sadios, avaliados em sete momentos experimentais, com intervalo quinzenal, entre o terceiro e o sexto mês de vida. Os dados foram submetidos à análise estatística, pela comparação entre as médias ou medianas, confrontadas pelo teste de Anova e Tukey, quando paramétricas, e pelo teste de Kruskal Wallis e Dunn, quando não paramétricas, considerando nível de significância $P \leq 0,05$ e tendência $P \leq 0,10$. Os dados que apresentaram dinâmicas semelhantes entre si foram submetidos ao teste de correlação de Pearson. Na região broncoalveolar, observaram-se um aumento progressivo das funções dos macrófagos alveolares, equilíbrio de secreção dos isotipos IgG1 e IgG2 e predominância de citocinas compatíveis com padrão de resposta Th1, até os 150 dias de vida dos bezerros. Aos 165 dias de vida, ocorreram diminuição da função celular, aumento dos títulos de IgG2 e aumento da citocina regulatória IL-10. Aos 180 dias, retornou-se o equilíbrio entre secreção de IgG1 e IgG2, diminuíram os teores de IL-10 e ocorreu tendência a aumento de IL-12, TNF- α e metabolismo oxidativo de macrófagos alveolares, o que permitiu concluir que a resposta imune tem característica própria, nesta faixa etária, e não se torna matura até os seis

meses de vida. Apesar de os fagócitos pulmonares já estarem eficientes, a partir dos 135 dias de vida, tornam-se hiperresponsivos aos 150 dias de vida, momento em que gera consequentemente uma resposta regulatória e/ou humoral aos 165 dias de vida, para que aos 180 dias de vida, o equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 seja atingido.

Palavras-chave: Bovinos. Fagocitose. Metabolismo oxidativo. Macrófago alveolar. Th1. Imunoglobulinas

ABSTRACT

BERTAGNON, H. G. **Evaluation of respiratory innate immune response in healthy calves during the second trimester.** [Avaliação da resposta imune inata respiratória em bezerros sadios durante o segundo trimestre de vida]. 2015. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The age between the third and sixth month of life is a peculiar period for the establishment of active immunity of calves. There is a greater susceptibility and lethality by bronchopneumonia, probably due to the immaturity of the pulmonary immune system, whether by an insufficient response, in the first moments, whether by an exaggerated cytotoxic response in the subsequent time. So, this work aimed to verify when the maturity of the immune system occurs, how the Th1 and Th2 profiles behave and if there is an exaggerated cytotoxic response during this active phase for immunity of the calves without maternal interference. For this purpose we studied the functions of phagocytosis and oxidative metabolism of blood and bronchoalveolar leukocytes, classes of immunoglobulins and cytokines incriminated in lymphocyte response patterns Th1 and Th2, in 10 holstein healthy calves. They were sampled every fifteen days, during the third until sixth month of life. Data were statistically analyzed by comparing the means or medians, confronted by ANOVA test and Tukey, when the data were parametric, and by Kruskal Wallis and Dunn's test, when the data were nonparametric, level of significance $p \leq 0.05$ and trend $p \leq 0.10$. The data that showed similar dynamics between them were subjected to Pearson correlation test. In bronchoalveolar region, until 150 days of age, the alveolar macrophages functions increased progressively, the IgG1 and IgG2 isotypes secretion showed a balance, and the cytokines profile were compatible with Th1 response. At 165 days of age, there was a decrease of cellular function, an increased of IgG2 titers and the IL-10 secretion, a regulatory cytokine, increased. At 180 days of life, we observed a balance of IgG1 and IgG2 secretion, a decreased of IL-10 levels and a tendency to increase IL-12, TNF- α and alveolar macrophage oxidative metabolism. These results indicated that the calves have an active immune response with particularities for this age group and it does not become mature until six months of life. Despite of the macrophages alveolar are already efficiency from the 135 days of age, they become more reactive at 150 days. After this moment, a regulatory and/or humoral response begins at 165 days of life, as the balance of Th1 and Th2 profiles are reached at 180 days of calves life.

Keywords: Cattle . Phagocytosis. Oxidative metabolism . Alveolar macrophage. Th1 . immunoglobulins

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Metabolismo oxidativo basal e estimulado de leucócitos CD14 ⁺ sanguíneos e de CH138 sanguíneos expresso em porcentagem (média e erro padrão da média), de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	53
Gráfico 2 -	Porcentagem (média e erro padrão da média) de fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> (SaPI) e <i>E coli</i> (EcPI) por leucócitos CD14 ⁺ sanguíneos e de CH138 sanguíneos, de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	53
Gráfico 3 -	Expressão e o metabolismo oxidativo estimulado (DCFH E) das células sanguíneas CD14 ⁺ de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	54
Gráfico 4 -	Porcentagem (média e erro padrão da média) do metabolismo oxidativo basal e estimulado de células broncoalveolares CD14 ⁺ de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	57
Gráfico 5 -	Porcentagem (média e erro padrão da média) de células CD14 ⁺ broncoalveolares realizando fagocitose de <i>Staphyloocccus aureus</i> (SaPI) e <i>Escherichia coli</i> (EcPI) de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	57
Gráfico 6 -	Expressão (média e erro padrão da média) da molécula CD14 e suas funções de metabolismo oxidativo estimulado (DCHF E), fagocitose de <i>Saphylococcus aureus</i> (SaPI) e <i>Escherichia coli</i> (EcPI) de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	58
Gráfico 7 -	Blox plot da expressão gênica da IL-10 por leucócitos sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	62
Gráfico 8 -	Blox plot da expressão gênica da IL-12 por leucócitos sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	63
Gráfico 9 -	Blox plot da expressão gênica da TNF- α por leucócitos sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014.....	63
Gráfico 10 -	Blox plot da expressão gênica da IL-10 por células broncoalveolares de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	65
Gráfico 11 -	Blox plot da expressão gênica da IL-12 por células broncoalveolares de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	65

Gráfico 12 -	Blox plot da expressão gênica de TNF- α por células broncoalveolares de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014.....	66
Gráfico 13-	Dinâmica da expressão gênica da citocina IL-10 (mediana e erro padrão da média) de leucócitos sanguíneos e células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária São Paulo – 2014.....	67
Gráfico 14-	Dinâmica da expressão gênica da citocina IL-12 (mediana e erro padrão da média) de leucócitos sanguíneos e células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária São Paulo-2014	67
Gráfico 15-	Dinâmica da expressão gênica da citocina TNF- α (mediana e erro padrão da média) de leucócitos sanguíneos e células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária São Paulo-2014	68
Gráfico 16-	Dinâmica da expressão gênica das citocinas IL-10 e IL-12 de leucócitos sanguíneos, intensidade média de fluorescência do metabólitos oxidativo estimulado de leucócitos sanguíneos CH138 (DCFH E CH138) e porcentagem do metabolismo oxidativo estimulado de leucócitos CD14 ⁺ (DCFH E CD14), de bezerros conforme a faixa etária São Paulo-2014.....	69
Gráfico 17-	Dinâmica da expressão gênica das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , metabólitos oxidativo estimulado de células CD14 ⁺ (DCFH E) e IgG1 da região broncolaveolar de bezerros, conforme a faixa etária São Paulo-2014.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias e desvios padrão das variáveis do hemograma dos bezerros conforme a faixa etária- São Paulo-2014.....	49
Tabela 2 -	Médias e desvios padrão das populações celulares broncoalveolares dos bezerros hígidos conforme a faixa etária, São Paulo-2014.....	49
Tabela 3 -	Média (erro padrão da média) das porcentagens dos leucócitos sanguíneos mononucleares (MNM) e expressão e funções das células CD14 ⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	51
Tabela 4 -	Medianas (erro padrão da média) das intensidades médias de fluorescência (IMF) da expressão e funções das células CD14 ⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	51
Tabela 5 -	Médias (erro padrão da média) das porcentagens da expressão e funções das células CH138 ⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	52
Tabela 6 -	Medianas (erro padrão da média) intensidades médias de fluorescência (IMF) da expressão e funções das células CH138 ⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	52
Tabela 7 -	Médias (erro padrão da média) das porcentagens da expressão e funções das células broncolaveolares CD14 ⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	55
Tabela 8 -	Medianas (erro padrão da média) intensidades médias de fluorescência (IMF) da expressão e funções das células broncoalveolares CD14 ⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros,	

	conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.....	55
Tabela 9 -	Médias (erro padrão da média) das dosagens séricas das imunoglobulinas IgG total, IgG1, IgG2, IgA e IgM de bezerros conforme faixa etária, São Paulo- 2014.	59
Tabela 10 -	Médias (erro padrão da média) das porcentagens das imunoglobulinas séricas IgG1, IgG2, IgA e IgM e razão entre IgG1/IgG2 de bezerros conforme faixa etária, São Paulo -2014.....	59
Tabela 11 -	Médias (erro padrão da média) das dosagens das imunoglobulinas broncoalveolares Ig total, IgG1, IgG2, IgA e IgM de bezerros conforme faixa etária, São Paulo-2014.....	60
Tabela 12-	Médias (erro padrão da média) das porcentagens das imunoglobulinas broncoalveolares IgG1, IgG2, IgA e IgM de bezerros conforme faixa etária, São Paulo-2014.....	61
Tabela 13-	Medianas (erro padrão da média) das interleucinas sanguíneas (razão entre mRNA citocinas alvo- IL-10, IL-12 e TNF- α em relação ao mRNA dos genes referencias- GAPDH e β actina).....	62
Tabela 14-	Medianas e desvios padrões das interleucinas das células broncoaleolares (razão entre mRNA citocinas alvo- IL-10, IL-12 e TNF- α em relação ao mRNA dos genes referencias- GAPDH e β actina).....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estratégia de análise de leucócitos sanguíneos de bezerros em citograma.....	40
Figura 2 -	Estratégia de análise de células broncolaveolares de bezerros em citograma.....	44
Figura 3 -	Imagens broncoscópicas de vias respiratórias de bezerros.....	48
Figura 4 -	Fluxograma do número amostral de bezerros hígidos conforme os momentos experimentais – São Paulo – 2014.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3	OBJETIVOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS E DELIANEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.1.1	Exame Clínico.....	33
4.1.1.1	<i>Exame específico do sistema respiratório.....</i>	33
4.1.1.2	<i>Inspeção indireta por broncoscopia.....</i>	34
4.2	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	34
4.2.1	Amostras de sangue.....	34
4.2.2	Hemograma.....	35
4.2.3	Expressão gênica das citocinas de leucócitos sanguíneos.....	35
4.2.3.1	<i>Extração de RNA e síntese de DNA complementar.....</i>	36
4.2.3.2	<i>PCR Quantitativo em tempo real portranscriptase reversa (RT-qPCR).....</i>	36
4.2.4	Ensaio de função celular.....	37
4.2.4.1	<i>Metabolismo oxidativo.....</i>	37
4.2.4.2	<i>Fagocitose.....</i>	38
4.2.4.3	<i>Avaliação da expressão da proteína CD14 e CH138 em leucócitos sanguíneos.....</i>	38
4.2.4.4	<i>Análise da citometria de fluxo.....</i>	39
4.2.5	Quantificação das Imunoglobulinas séricas.....	41
4.2.6	Coleta de lavado broncoalveolar (LBA).....	41
4.2.7	Isolamento da suspensão celular das amostras de LBA.....	42
4.2.8	Viabilidade e concentração celular das amostras de LBA.....	42
4.2.9	Perfil celular.....	43
4.2.10	Ensaio de função celular e análise em citometria de fluxo.....	43
4.2.11	Quantificação de imunoglobulinas broncoalveolares.....	45
4.2.12	Expressão gênica das citocinas de células broncoalveolares.....	45
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS.....	47

5.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	47
5.2	AVALIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS: FUNÇÃO E IMUNOFENOTIPAGEM.....	50
5.3	AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS BRONCOALVEOLARES: FUNÇÃO E IMUNOFENOTIPAGEM.....	54
5.4	DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINAS.....	58
5.5	DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS BRONCOALVEOLARES.....	60
5.6	EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS.....	61
5.7	EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS DAS CÉLULAS BRONCOALVEOLARES.....	64
6	DISCUSSÃO.....	72
6.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	73
6.2	AVALIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS E CÉLULAS BRONCOALVEOLARES.....	74
6.3	DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS E BRONCOALVEOLARES.....	81
6.4	EXPRESSÃO GÊNICA DAS CCITOCINAS DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS E CÉLULAS BRONCOALVEOLARES.....	85
7	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo a agropecuária desempenha um relevante papel no cenário da economia nacional, culminando na busca constante de aprimorar seus conhecimentos e suas técnicas para aumentar a eficiência produtiva. Para isto, incentiva-se o investimento em genética, nutrição, manejo e reprodução, agregando valor econômico aos animais para potencializar a criação bovina, mas ignoram-se alguns aspectos fisiológicos dos animais, o que pode aumentar a susceptibilidade de doenças (RADOSTITIS et al., 2002).

As características anatômicas e fisiológicas bovinas do trato respiratório apresentam características que propiciam a permanência prolonga de patógenos na região. (GONÇALVES et al., 2000; ACKERMAN, DERSHEID; ROTH, 2010). Soma-se a isto, a imaturidade do sistema imunológico, que embora seja ativa desde as primeiras semanas de vida, ainda é fraca, lenta e pouco eficiente até o quinto mês de vida (CORTESE, 2009).

Embora a susceptibilidade de bezerros ao complexo respiratório de bovinos seja alta entre o primeiro ao quinto mês de vida (GONÇALVES et al., 2000), as pesquisas que focam seus estudos no primeiro trimestre de vida dos bezerros, com o escopo de identificar quando, de fato, ocorre a maturação do sistema imune (CORTESE 2009; BATISTA et al., 2012), como ele se comporta quando desafiado (ACKERMAN et al, 2010), bem como pesquisar períodos, formulações e vias ideais para imunizações eficientes e precoces (KALINA; WOOLUMS; GERSHWIN, 2005; MEYER; DEPLANCHE; SCHELCHER, 2008; ANTONIS et al., 2010; CHATTA et al., 2010) e preterem informações sobre o segundo trimestre de vida dos bezerros.

Neste período, ocorre o estabelecimento da imunidade própria independente de fatores maternos e como os animais ainda são mais susceptíveis a afecções respiratórias, sugere-se o uso de medidas profiláticas (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Na idade de três de meses, o sistema imunológico já é capaz de montar uma resposta imune protetiva, por isso, convencionou-se o uso de vacinas entre três a cinco meses de idade (RADOSITS et al., 2000; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Todavia, não existe uma preocupação quanto às diferentes magnitudes de resposta imunológica que possam ser verificadas nestes momentos.

Infecções experimentais demonstram que bovinos neonatos montam uma resposta inflamatória menos robusta e com eliminação viral pouco eficiente em comparação com animais de idade intermediária (três a cinco meses). Isso sugere que, na fase intermediária, a

resposta inflamatória mais proeminente esteja relacionada a uma resposta imune exagerada, o que corrobora com os indícios da literatura que defende que a maior gravidade de broncopneumonias (GRELL et al., 2005a; PLATT et al., 2009) e o elevado índice de letalidade da doença (SNOWDER et al., 2006; GORDEN; PLUMMER, 2010) ocorre entre o terceiro ao quinto mês de idade dos bovinos.

Além dessas consequências, é importante mencionar a existência de um possível desequilíbrio entre os perfis de resposta Th1 e Th2 (MENA et al., 2002; GRELL et al., 2005b; LEACH et al., 2012; OHTSUKA et al., 2014), o que seria um fator determinante para a manifestação desta resposta imune exagerada (MEYER; DEPLANCHE; SCHELCHER, 2008; PLATT et al., 2009; ANTONIS et al., 2010)

Ressalva-se que os estudos retromencionados avaliaram um número pequeno de animais, de quatro a seis, com diferentes faixas etárias, inoculados com patógenos e avaliados por curto espaço de tempo (uma a duas semanas), estando sujeitos a variações individuais e submetidos a condições não convencionais de criação de bezerros (KAMPEN et al., 2006). Para afastar tais distorções e estudar isoladamente a influência do fator etário na caracterização da resposta imune própria, período de três a seis meses de idade, quando ocorre o estabelecimento de resposta imune ativa, foram empregados na pesquisa, animais saudáveis e, portanto, em condições basais, em número amostral maior, por um período prolongado e em condições normais de manejo.

Considerando que maturação do sistema imune pulmonar não se conclui até o terceiro mês de vida dos bezerros (BATISTA et al., 2012) e considerando que a alta susceptibilidade de bezerros à broncopneumonia se estende até o quinto mês de vida (GONÇALVES et al., 2000), pretende-se verificar o momento em que ocorre a maturação do sistema imune pulmonar, identificar a existência de um desequilíbrio no perfil Th1 e Th2 e averiguar se há resposta citotóxica exagerada relacionada a este desequilíbrio.

Tais objetivos referem-se à hipótese de que, neste período de transição para imunidade própria, o sistema imunológico pulmonar aumenta progressivamente sua efetividade de resposta até se tornar exagerada, momento em que o equilíbrio entre os perfis de respostas Th1 e Th2 passa a controlar as respostas citotóxicas hiperreativas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Constantemente os bovinos estão expostos a agentes agressores que incitam respostas imunológicas de diferentes magnitudes. Tal interação dependerá de como os fatores do ambiente, do hospedeiro e dos patógenos ativam os mecanismos de defesa física, celular e humoral, arquitetando uma resposta que resultará desde a hígidez até os diversos graus de severidade da doença (TIZARD 2009, ABAS, LITCHMAN; PILLAI, 2012).

Dentre os diferentes órgãos e sistemas dos bovinos que podem ser afetados, destaca-se o sistema respiratório. A começar pela sua anatomia, que permite comunicação do meio externo (ambiente) com o organismo animal, sendo frequente o contato das vias aéreas com microrganismos, que podem colonizar e se multiplicarem na região, alterando sua função, o que compromete a qualidade e quiçá a vida do paciente (ACKERMANN et al., 2010; GRIFFIN et al., 2010).

Soma-se ainda características anatomofisiológicas da espécie bovina, como vias aéreas estreitas, caixa torácica muito rígida, volume pulmonar pequeno e a compartimentalização pulmonar, que são responsáveis por trocas gasosas menos efetivas, atividade macrofágica alveolar mais lenta e menor velocidade de depuração pulmonar em comparação às demais espécies. Estes fatores prolongam a permanência de patógenos inalados no trato respiratório, o que torna esta espécie, mais susceptível a afecções respiratória (GONÇALVES et al., 2000; ACKERMANN et al., 2010; GRIFINN et al., 2010).

Contribuem também para esta maior susceptibilidade, fatores ambientais comumente vivenciadas durante criações convencionais de bezerros como extremos de temperatura, gases irritantes inalados, má ventilação e excesso de umidade, que interferem na defesa respiratória, podendo gerar diferentes graus de comprometimento imune pulmonar, além de favorecerem a multiplicação de patógenos cuja frequente inalação, facilita a ocorrência de doenças (GRIFINN et al., 2010; BERTAGNON et al., 2011, COBB et al., 2014).

Apesar das características dos patógenos relacionadas ao grau de infecciosidade, imunogenicidade, patogênese, virulência e contagiosidade também influenciarem os mecanismos imunes (THRUSFIELD, 2014), a maioria das bactérias causadoras do

complexo respiratório dos bezerros são habitantes comensais da nasofaringe de bovinos hígidos (GRIFFIN et al., 2010; BENESI et al., 2013). São frequentemente inaladas e na maioria das vezes, eliminados pela depuração mucociliar em até quatro horas, sem causar doença alguma. Similarmente, as principais viroses relacionadas a este complexo também são assintomáticas, contudo quando existe interação entre agentes bacterianos e virais, associados ou não aos fatores ambientais, aumenta-se a chance de ocorrer afecção respiratória (GRIFFIN et al., 2010).

O sistema imune ainda pode ser afetado por inúmeros outros fatores que cuem sua menor efetividade, como estresse do desmame, transporte, castração, vacinações e união de diferentes animais ((RAIDAL; DAILY; LOVE, 1997; ISHIZAKI; HANAFUSA; KARIYA, 2005; BELLINAZZI et al., 2013; COBB ET AL, 2014).

O fator etário é de suma importância para a competência do sistema imune (KAMPEN et al., 2006; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Inicialmente é bastante dependente da imunidade materna passivamente adquirida, que vai sendo paulatinamente substituída pela resposta imune ativa dos bezerros, caracterizando uma fase de transição, período conturbado, pois os teores de anticorpos maternos decaem progressivamente enquanto inicia-se a resposta imune ativa, que torna-se-á eficiente por volta dos 5 meses de idade (CORTESE, 2009).

Posto isto, destaca-se a broncopneumonia como uma das afecções mais frequente em bezerros, sendo responsável por 24,63% das mortes em bezerros com até 90 dias de idade (SANTRA; PACHALAG, 1996). Em um trabalho com 18 mil bovinos de 972 fazendas diferentes e nove raças taurinas com aptidão para carne, encontrou-se maior incidência de doenças respiratórias nos animais entre o terceiro e o sexto mês de vida, normalmente logo após o desmame (SNOWDER et al., 2006).

Para bovinos de leite, a maior incidência de broncopneumonias ocorre até o quinto mês de idade (GONÇALVES et al., 2000), encontrando-se menor mortalidade antes do desmame (22,5%), realizado na oitava semana de vida, em comparação ao período pós desmame (44,6%) (GORDEN; PLUMMER, 2010).

Embora Kampen et al. (2006) e Antonis et al. (2010) correlacionarem que o declínio máximo de imunoglobulinas coincide com o período de maior mortalidade por afecções respiratórias, a situação não se confirma quando cruza-se os dados de diferentes trabalhos. Relata-se que o declínio dos anticorpos maternos atingem teores mínimos entre os 30 e 90 dias de vida conforme a raça (FEITOSA et al., 2001;

PAULETTI et al., 2002; LEAL et al., 2003; COSTA et al., 2008) enquanto que a doenças respiratórias apresentam maior índices de letalidade entre os 150- 180 dias de vida dos bezerros (SNOWDER et al., 2006; GORDEN; PLUMMER, 2010). Estes dados conflitantes da literatura motivam discutir a maturação do sistema imune durante a fase de estabelecimento de imunidade ativa própria.

Defesa respiratória

A defesa do sistema respiratório começa pela filtração aerodinâmica imposta por barreiras físicas da própria anatomia do animal. Partículas menores são depositadas no epitélio ciliar traqueal, sofrem retropropulsão até a faringe, onde são engolidas ou eliminadas pelos reflexos de tosse ou espirro, pelo mecanismo de depuração mucociliar, (ALBERTS et al., 2002; GONÇALVES e FEITOSA, 2014). As partículas que conseguem ultrapassar essa barreira estão sujeitas a fatores antimicrobianos e defesa celular e humoral presentes na superfície do epitélio pulmonar (ACKERMAN; DERSCHIED; ROTH, 2010). O surfactante e defensinas possuem proteínas e peptídeos que se aderem à superfície de patógenos e juntamente com as imunoglobulinas e fatores do complemento, auxiliam a fagocitose por macrófagos alveolares residentes e neutrófilos.

A principal célula residente do trato respiratório posterior é o macrófago alveolar, havendo uma proporção aproximada de: 68,80% de macrófagos, 11,10% de neutrófilos, 1,90% de linfócitos, e menos de 1% de eosinófilos para bezerros acima de 1 mês de idade (LIGGITT, 1985; GONÇALVES et al., 2004; GRIFFEN et al., 2010).

Os macrófagos alveolares são responsáveis pela fagocitose de partículas exógenas e modulam a resposta imune mantendo a homeostase imunológica no pulmão. Fagocitam, processam e apresentam antígenos a outras células mobilizadas mediante secreção de mediadores inflamatórios (LOHMANN-MATTHES, STEINMÜLLER & FRANKE-ULLMANN; 1994; ACKERMAN; DERSCHIED; ROTH, 2010).

Estes macrófagos são classificados em M2 - macrófagos alternativamente ativados, presentes no tecido hígido e nas fases finais da inflamação. São responsáveis pela reparação tecidual, limitando a resposta inflamatória por meio da secreção das citocinas anti inflamatórias (IL-4 e IL-10) e secretando componentes da matriz extracelular. Já os macrófagos classicamente ativados (M1), ficam quiescentes no tecido hígido, apresentando o fenótipo M1 somente quando há secreção de citocinas

inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Participam das fases iniciais da inflamação, possuem alta atividade de metabolismo oxidativo e secretam citocinas inflamatórias que perpetuam a inflamação (MOSSER; EDWARD, 2008; SINDRILARU e al., 2011).

Em segundo lugar encontramos os neutrófilos que são mais ágeis na fagocitose e metabolismo oxidativo que os macrófagos (ROTHER; VALET, 1990; BURTON et al., 2005), porém liberam produtos reativos que podem causar injúrias teciduais (ACKERMAN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Ambas as células, possuem receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dentre os diferentes grupos de receptores, a família dos receptores do tipo Toll – *Toll Like* (TL), é a mais estudada em bovinos, sendo identificados 10 destes receptores. O receptor TL-2 reconhece peptidoglicanas de bactérias Gram positivas, presentes em *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp, lipoarabinomano das mycobacterias e zimosan de fungos. Já o receptor TL-4 reconhece o lipopolissacarídeo presente nas bactérias Gram negativas (EICHER et al., 2004; TIZARD, 2009; ACKERMAN; DERSCHEID; ROTH, 2010), encontrada nos microrganismos *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, e *Pasteurella multocida* e enterobactérias. Estes microrganismos Gram negativos, juntamente com os *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp, são as bactérias mais implicadas nos quadros de broncopneumonia dos bezerros (ACKERMAN; DERSCHEID; ROTH, 2010; GRIFFIN et al., 2010; BENESI et al., 2013).

Uma vez reconhecido o patógeno, estes fagócitos ativados englobam as partículas microbianas, e desencadeiam o metabolismo oxidativo responsável pela oxidação das partículas internalizadas (BURTON et al., 2005). Embora existam diversas enzimas e grânulos citoplasmáticos envolvidos na eliminação de partículas intracelulares, o metabolismo oxidativo é o mecanismo mais importante (BURGOS et al., 2011). Neste processo, há ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase (NADPH) que transfere elétrons para o citosol formando espécies reativas de oxigênio (ERO) como anion superóxido e peróxido de hidrogênio, dos quais derivam metabólitos oxidantes, direcionados para a eliminação de patógenos internalizados (BURGOS et al., 2011).

Estas duas células, juntamente com as células *natural killers* (NK), derivadas de linfócitos, participam da imunidade natural ou imunidade inata, que é a primeira linha de defesa contra os microrganismos. Estão programadas para responder rapidamente à

infecção, por meio das células residentes e/ou recrutando mais células. Dentre as células mobilizadas estão os neutrófilos e monócitos do sangue e macrófagos intersticiais e células dendríticas de locais adjacentes (ABBAS, LICHTMAN & PILAI, 2012; TIZARD, 2009, ACKERMAN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Como o sistema imune inato não tem memória, cada infecção é tratada da mesma maneira e intensidade, não importando a frequência com que encontre o patógeno, sendo esta resposta imediata quando se encontra um invasor (TIZARD, 2009).

Paralelamente a esta primeira tentativa de eliminar patógenos, estimula-se uma resposta imunológica adaptativa, com geração de células efetoras antígeno-específicas e de células de memória que podem prevenir uma infecção quando o mesmo microrganismo já é conhecido. Neste caso a resposta é mais eficiente e magnitude da inflamação acompanha a gravidade da afecção (ABBAS, LICHTMAN & PILAI; 2012).

Fazem parte desta resposta adaptativa os linfócitos, que encontram-se em pequena quantidade nos pulmões. Durante a inflamação são liberados fatores quimiotáticos e citocinas que ativam estes linfócitos, que são recrutados do tecido linfóide associado aos brônquios, distribuídos ao longo das vias aéreas ou em outros agregados linfóides localizados no interstício pulmonar (ABBAS, LICHTMAN & PILAI; 2012; TIZARD, 2009).

O tecido linfóide associado aos brônquios varia significativamente de acordo com a idade dos animais. Está ausente em bezerros com quatro dias de vida e, a partir de quatro meses de idade, vai aumentando sua proporção progressivamente até 18 meses e decresce ligeiramente na idade adulta. (ANDERSON et al., 1986)

Conforme ocorre a liberação dos mediadores inflamatórios pelas células da imunidade inata, os linfócitos se diferenciam em células NK, B e T. (ABBAS, LICHTMAN; PILAI; 2012).

Os Linfócitos B aumentam continuamente até o segundo mês de vida (KAMPEN et al., 2006; CHATTA et al., 2010) e estão relacionados à formação de anticorpos, que participam da defesa específica mais importante do pulmão (LIGGITT, 1985).

Os principais isotipos das imunoglobulinas encontradas no trato respiratório são IgA, IgM, IgG1, IgG2 e traços de IgE. A IgA é uma imunoglobulina relacionada com as neutralizações virais, de enzimas e de toxinas, e impede a aderência do patógeno à

mucosa, sendo a imunoglobulina mais abundante no trato respiratório (KALINA; WOOLUMS; GERSHWIN, 2005; BATISTA, 2011).

A IgG, opsoniza a bactéria facilitando a sua destruição (CHASE, HURLEY; REBER, 2008; TIZARD, 2009). Enquanto o isotipo IgG1 está relacionado com resposta tipo Th2 e auxilia aglutinando partículas de antígeno, o isotipo IgG2 a é compatível com resposta padrão Th1 auxiliando função neutrofílica (KIDD, 2003). A IgM é a primeira imunoglobulina a ser produzida durante a resposta imune e atua ativando o complemento, e auxiliando a opsonização e neutralização de vírus. A IgE está em baixas concentrações no soro sanguíneo e trato respiratório, aumenta rapidamente em quadros alérgicos e parasitários, além de auxiliar na degranulação de mastócitos e basófilos (TIZARD, 2009; ABBAS, LICHTMAN & PILAI, 2012).

Tal qual o número e função das células inatas, a secreção das imunoglobulinas também sofre influência etária. Em bezerros há supressão das respostas de memória e das mediadas por células, favorecendo a produção de anticorpos, especialmente a produção de IgM e IgG1 (PRINGLE et al., 1988; KALINA; WOOLUMS; REBER, 2005; CHASE, HURLEY; REBER, 2008; BATISTA, 2011)

A produção ativa das imunoglobulinas inicia-se entre 60 a 90 dias, parecendo ser mais precoce nos animais mais expostos a patógenos, especialmente nos de criação intensiva (PRADO et al., 2006; VETTORATO et al., 2012). Segundo Chase, Hurley e Reber (2008) os teores máximos de imunoglobulinas são atingidos aos quatro meses de idade. Nesta idade, predominam os teores de IgA, e em segundo lugar os de IgG2, parecendo haver uma inversão entre os teores de IgG1 e IgG2 posterior aos quatro meses de idade (KALINA; WOOLUMS; REBER, 2005; PRADO et al., 2006).

Em relação aos linfócitos T, estes podem ser classificados em células gama delta e alfa beta. As células gama delta representam 60% dos mononucleares sanguíneos em bezerros neonatos, e vão sendo substituídas aos poucos pelas células B (CD21⁺) e T helper (CD4⁺) conforme os bezerros ficam mais velhos. Sua função não é bem conhecida, mas parece estar envolvida na integração entre a resposta imune inata e adaptativa e no reconhecimento de antígenos não proteicos. Estas células podem ainda expressar os fenótipos WC11, considerado população inflamatória, enquanto que o fenótipo CD1 parece ser regulatório (KAMPEN et al., 2006; ACKERMAN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Nas células alfa beta estão inclusos os linfócitos auxiliares ou *T helper* ($CD4^+$), os citotóxicos ($CD8^+$) e as *Natural killer* (NK). Os linfócitos auxiliares participam da resposta imune pelo reconhecimento de antígenos e subsequente diferenciação em suas subpopulações efectoras *T helper 1* (Th1) e *T helper 2* (Th2), onde o perfil Th1 favorece a resposta imune celular ou citotóxica, inibindo as células Th2, enquanto as células Th2 auxiliam a produção de anticorpos, inibindo a resposta Th1 (KIDD, 2003, TIZARD, 2009).

Muitas são as células que podem atuar como inflamatórias citotóxicas (M1, neutrófilos, NK, Th1, CD8) ou inflamatórias humorais e imunorreguladoras (M2, TH2, Linfócitos T regulatório e linfócitos gama delta W1). Ambos perfis são necessários para a eliminação eficiente dos diferentes patógenos e evitam uma perpetuação exagerada da resposta imune, que pode se tornar danosa ao hospedeiro. Tal controle é exercido por um fino ajuste orquestrado por mediadores inflamatórios como citocinas e quimicinas (HOEK et al., 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008; TIZARD 2009).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular que atuam na comunicação intercelular. São produzidas e secretadas por diversas células do sistema imune, sendo os linfócitos e macrófagos os tipos celulares produtores predominantes (TIZARD, 2009; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

De uma maneira simplificada, as citocinas podem ser classificadas como pro inflamatórias e anti inflamatórias. As pro inflamatórias maximizam diferentes etapas na resposta imunológica, neste caso implica-se as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20) o fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon (INF- γ). As anti inflamatórias, atuam também em processos alérgicos (IL-4, IL-5, IL-10) e imunomoduladores (IL-10, IL-13, TNF- γ e IL-19 (Varella, Fortes, 2001).

Dentre as inflamatórias, cita-se a IL-12, que é produzida principalmente por células da linhagem monócito- macrófago e células B. É secretada rapidamente durante infamação, promovendo a diferenciação de linfócitos Th *naive* em Th1, que secretam as citocinas IL-2, IL12, INF- γ , TNF- α que ativam a proliferação e função das células citotóxicas, suprimindo a síntese de IL-4, IL-10 e imunoglobulinas (Tizard 2009, Kidd 2003)

O TNF- α é produzido por macrófagos, mastócitos, células T, B endoteliais e fibroblastos. Participam modulando a inflamação e proliferação de células citotóxicas.

Ativa o metabolismo oxidativo de macrófagos e promove a secreção de IL-1, IL-6 e fatores de crescimento de colônia de granulócitos e de mononucleares (Sindrilaru et al., 2011; Tizard 2009, Kidd 2003)

Anti inflamatória, cita-se a IL-10, uma citocina que regula a inflamação diminuindo a função das células T, NK, neutrófilos e macrófagos. É produzida pelas células Th2, linfócitos T reg e macrófagos M2, inibindo a diferenciação das células T naive em Th1 e a produção de suas principais citocinas IL-2, INF- γ , TNF- α , TNF- β , IL-12 e IL-6 (KIDD, 2003; HOEK et al., 2008; SINDRILARU et al., 2011; ALMERIA et al., 2012)

A IL-4 é a principal citocina relacionada à diferenciação das células T *naive* em Th2. É produzida principalmente por eosinófilos, basófilos, linfócitos T e mastócitos. Juntamente com a IL-5 promove a ativação da resposta humoral, aumentando a secreção de IgE em resposta a parasitas e alérgenos (KIDD, 2003; VOERINGER; SHINKAI; LOCKSLEY, 2004; HOLMGREN et al., 2014).

Apesar das citocinas guiarem uma resposta característica alérgica ou citotóxica em humanos e camundongos, para bovinos esta divisão não é clara (MENA et al., 2002). Bezerros neonatos montam uma resposta predominante Th2, baseado em aumento de IL-4, mesmo sem apresentar aumento de eosinófilos, basófilos ou de títulos de IgE, o que caracterizaria uma resposta alérgica (GRELL et al., 2005 a; ANTONIS et al., 2010; HOLMGREN et al., 2014). Além disso, bezerros mais velhos podem montar uma resposta Th1, mantendo altos teores de secreção de IL-10, uma citocina caracterizada como perfil Th2 (ALMERIA et al., 2012).

Infere-se ainda que uma maior gravidade e letalidade das afecções respiratórias no segundo trimestre de vida dos bezerros parece estar ligado ao desbalanço entre os perfis de resposta Th1 e Th2 (GRELL et al., 2005 a,b; PLATT et al., 2009).

No entanto estes perfis de resposta só foram estudados em animais vacinados (MENA et al., 2002; ANTONIS et al., 2010; LEACH et al., 2012) ou submetidos a infecções parasitárias (INGALE et al., 2008; ALMERIA et al., 2012; HOLMGREN et al., 2014), mas não em condições basais. Ressalta-se ainda que os trabalhos retromencionados não correlacionam os perfis de resposta Th com os efeitos citotóxicos ou humoral encontrados.

Levando-se em conta que a resposta Th1 e Th2 parece sofrer influência etária e não é bem tão característico para a espécie bovina como para humanos e camundongos,

faz-se necessário buscar estas informações para melhor compreensão da imunofisiologia dos bovinos, bem como fornecer conhecimentos que possam minimizar as mortalidade de bezerros por doenças respiratórias nesta fase de estabelecimento de imunidade ativa.

Maturação da resposta imune

Como mencionado no item anterior, em broncopneumonias, os fagócitos reconhecem patógenos, se ativam e recrutam outros tipos celulares do sangue para o local (ACKERMAN; SCHEID; ROTH, 2010). Assim, para este processo ser efetivo, as células envolvidas na resposta imune local e sistêmica também devem estar eficientes.

Durante os primeiros trinta dias de vida dos bezerros, sua capacidade de montar uma resposta imune é lenta, fraca e pouco eficiente (CORTESE 2009). Sua defesa é altamente dependente de transferência de imunidade passiva, onde imunoglobulinas e células são adquiridas por meio da mamada do colostro. Nesta fase, o neonato que mamou colostro de qualidade e quantidade dificilmente ficará doente, e quando acontecer, a pneumonia costuma ser mais branda (RADOSTIS et al, 2010).

Entre os 30 e 90 dias de vida dos bezerros, estas imunoglobulinas maternas vão sendo consumidas (FEITOSA et al., 2001 a; PAULETTI et al., 2002; LEAL et al., 2003; COSTA et al., 2008). Conforme o sistema imunológico é estimulado, inicia-se uma produção ativa de imunoglobulinas séricas, atingindo sua maturação entre quatro a seis meses de idade (PRADO et al., 2006; CHASE; HURLEY; REBER, 2008;). Até esta idade a classe predominante é do isótopo IgG1 (Batista, 2011), proveniente do colostro materno, que exerce um efeito supressor para os demais isotipos e classes de imunoglobulinas (KIMMAN et al., 1987).

A dinâmica das imunoglobulinas broncoalveolares acompanha a dinâmica das séricas durante o primeiro mês de vida (PRINGLE et al., 1988; KALINA; WOOLUMS; GERSHWIN, 2005; BERTAGNON et al., 2007) e posteriormente seguem dinâmica própria (PRADO et al., 2006; BATISTA, 2011)

Entre o quinto e oitavo mês de vida dos bezerros, o sistema de apresentação de antígenos ainda é lento (VELILLA; RUGELES; COUGNET, 2006; REBER et al., 2008). A resposta neutrofílica já é efetiva desde o primeiro mês de vida, porém a produção de espécies reativas de oxigênio apresenta um aumento contínuo até o

segundo mês de vida em bovinos nelore, até o terceiro para bezerros holandeses e até o quarto mês de vida em bovinos limousin (KAMPEN et al., 2006; COSTA et al., 2008).

A expressão de determinados receptores tem sido incriminada como marcadores de ativação. Assim, Reber et al. (2008) identificaram que a linhagem monócito/macrófago e células dendríticas sanguíneas de bezerros que receberam colostro integral apresentou maturidade mais precoce em comparação aos bezerros que receberam colostro livre de células frente a expressão dos marcadores MHC I e CD 25, CD11 e CD14 e valores absolutos destas células. O maior afluxo de monócito CD11 e CD14 no sangue poderia significar uma apresentação de antígeno menos eficiente, pois precisou-se de um maior número destes monócitos em comparação aos monócitos MHC I e CD 25 positivos, para gerar a mesma resposta leucocitária e humoral necessária para manter os bezerros saudáveis.

Os monócitos também possuem diferentes graus de resposta inflamatória conforme a capacidade de fagocitose, metabolismo oxidativo e secreção de fatores quimiotáticos conforme a expressão dos receptores CD14 e CD16 (SHI; PALMER, 2011; HUSSEN et al., 2013).

A contínua inalação de microrganismos estimula as células do trato respiratório a saírem de um estado quiescente, mantido por fatores supressivos contidos no colostro, para se tornarem ativas (PRINGLE et al., 1988; BERTAGNON et al., 2007). Até os 90 dias de vida dos bezerros, os macrófagos alveolares ainda não estão na sua atividade máxima, tornando os bezerros mais susceptíveis a infecções respiratórias em comparação as outras idades (BATISTA et al., 2013).

Como os monócitos são os precursores das células dendríticas e macrófagos alveolares, é possível que a maturação de ambas as células ocorra na mesma faixa etária. No entanto foi evidenciado que a dinâmica das imunoglobulinas séricas e broncolaveolares são distintas a partir dos 90 dias de vida (PRADO et al., 2006; BATISTA, 2011) gerando-se a dúvida se a maturação imune broncoalveolar acompanha a sistêmica.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é caracterizar a resposta imune pulmonar durante a fase de estabelecimento da imunidade ativa do bezerro, tendo como objetivos específicos:

- 1- Verificar o momento em que ocorre a maturação do sistema imune pulmonar.
- 2- Identificar a existência de um desequilíbrio no perfil Th1 e Th2.
- 3- Averiguar se há resposta citotóxica exagerada relacionada a este desequilíbrio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em 27 de julho de 2011, protocolado sob o nº 2224/2011.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo longitudinal, onde 10 bezerros machos, da raça holandesa branca e preta, sadia foram acompanhados durante o segundo trimestre de vida (desde 90^o ao 180^o dia de vida). Estes animais provenientes de propriedades próximas a São Paulo mamaram colostro e a partir dos 15 dias de vida, foram transportados para o biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP, sendo alocados em baias coletivas. Durante a noite, dois a três bezerros permaneciam em baias de 137,5 cm de largura por 200 cm de comprimento, de piso de concreto coberto com cama de maravalha. E durante o dia, cinco animais permaneciam soltos em local acimentado com cama parcial de maravalha e com incidência de sol. A limpeza e desinfecção dos locais eram realizadas diariamente e repetidas sempre que necessário, por meio de lavagens diárias, utilização de solução de hipoclorito (10%) e reposição de cama limpa.

O manejo alimentar foi constituído pela ingestão inicial de leite integral em pó¹ fornecido em dois litros pela manhã e igual volume à tarde em mamadeiras, 1 kg de ração inicial peletizada² por animal, água, sal mineral³ e feno de tifton *ad libitum*. A partir do segundo mês de vida os bezerros foram desmamados e a partir do terceiro mês de vida participaram do experimento.

Durante o período experimental, esses animais foram pesados e examinados clinicamente e tiveram sua função imune sanguínea e broncolaveolar avaliadas em sete momentos experimentais, iniciando aos 90 ($\pm$ 2) dias de vida e depois sucessivamente até os 180

¹ Piracanjuba®

² Ração Ternerina® com 40kg- Marca Purina

³ Purina Gold® com 30kg- Marca Purina

($\pm$ 2) dias de idade com intervalos de 15 dias entre as colheitas.

Durante a fase experimental, utilizou-se como critério de inclusão amostral o exame clínico, hemograma e citologia broncoalveolar. Caso alguma alteração fosse encontrada utilizando como referência os preceitos estabelecidos por Dirksen, Grunder e Stober (1993) e Gonçalves e Feitosa (2014) para exame clínico, Schalm (1965) e Peixoto et al. (2002) para o hemograma e Gonçalves et al. (2004), Griffin et al. (2010) e Benesi et al. (2012) para a citologia broncoalveolar, excluiu-se o momento amostral, para garantir que os resultados representassem uma dinâmica apenas de animais hígidos.

4.1.1 Exame Clínico

Os animais foram avaliados pelos métodos semiológicos classicamente preconizados por Dirksen (1993), na qual foram realizadas as avaliações das funções vitais constituídas por frequências respiratória e cardíaca, temperatura corporal, movimentos ruminais, estado de hidratação, coloração das mucosas aparentes e palpação de linfonodos.

Posteriormente, foi realizado o exame específico do sistema respiratório, com o emprego dos diferentes meios semiológicos como a inspeção, palpação, percussão, auscultação e olfação (GONÇALVES e FEITOSA, 2014).

4.2.1 Exame específico do sistema respiratório

Na inspeção direta do sistema respiratório dos animais avaliou-se a frequência, o tipo e o ritmo respiratório. Em seguida foi realizada a inspeção nasal, observando a presença de secreção, umidade do muflo e coloração da mucosa.

O exame foi seguido pela palpação, verificando-se a velocidade e temperatura do fluxo de ar expirado, reflexo da tosse e palpação do tórax.

A percussão foi realizada dos seios paranasais até porção final de tórax.

Foi realizada a auscultação de vias anteriores e de campos pulmonares, o exame foi realizado no sentido cranio-caudal e dorso-ventral da região torácica de cada animal.

E por fim foi realizada a olfação, avaliando-se o odor da respiração exalado.

4.1.1.2 Inspeção indireta por broncoscopia

A inspeção indireta do sistema respiratório foi realizada por meio de broncoscopia, utilizando um videogastrosκόpio flexível⁴, com 8,2 mm de diâmetro e comprimento de trabalho de 1100 mm, acoplado a uma processadora de imagens com fonte de luz⁵.

Para realização do exame, cada animal foi submetido a jejum sólido de 12 horas, sedado com 0,02 mg/kg de xilazina⁶ por via intramuscular e mantido em estação, com a cabeça elevada. Após utilização de spray de lidocaína a 2% na narina, inseriu-se o endoscópio pela narina em direção aos pulmões, observando-se toda a via aérea até a região de brônquios principais.

4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises laboratoriais foram realizadas em amostras sanguíneas e de lavado broncoalveolar.

4.2.1 Amostras de sangue

A coleta de sangue venoso foi realizada por punção da veia jugular externa, com antisepsia prévia, utilizando tubos a vácuo com anticoagulante EDTA para realização de

⁴ EG-250PE5, Fujinon®

⁵ System 2200 Processor, Fujinon®

⁶ Calmion® 2%, Agener União Saúde Animal

hemograma (Birgel, 1982). Em tubos a vácuo contendo heparina sódica como anticoagulante para realização dos ensaios de expressão gênica das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α e ensaios de função leucocitária (fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio). E em tubos a vácuo sem anticoagulante para as mensurações de imunoglobulinas (IgG₁, IgG₂, IgM e IgA).

4.2.2 Hemograma

Para realização do hemograma, o número total de leucócitos e de eritrócitos por microlitro foi mensurado por meio de analisador automático de hematologia⁷ e a diferenciação do padrão leucocitário foi feita em esfregaços sanguíneos corados com corante Rosenfeld, classificados em microscópio óptico em objetiva de imersão de 1000x de acordo com as características morfológicas em linfócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, monócitos, eosinófilos e basófilos.

4.2.3 Expressão gênica das citocinas de leucócitos sanguíneos

Para estas dosagens, separou-se o botão leucocitário dos demais constituintes do sangue heparinizado por meio de centrifugação (3500rpm X 15 min a 4°C). A partir deste momento todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar, utilizando materiais e soluções estéreis e livre de RNase. O botão leucocitário foi acondicionado em tubos tipos *falcon* de 15 ml sofrendo lise osmótica das hemácias ainda presentes na amostra. Posteriormente lavou-se os leucócitos com 1 mL de meio de cultura RPMI 1640⁸, e após centrifugação (10000 rpm X 8 min a 4°C) congelou-se o botão leucocitário em 500 μ L de Trizoltm reagente⁹, a temperatura de -80°C até a extração de RNA, por um período máximo de 2 meses de congelamento.

⁷ ABC Vet.® Marca ABXTM Horiba, Montpellier, France.

⁸ Roswell Park Memorial Institute – RPMI 1640 Sigma® R7638

⁹ Invitrogen Corp., SP, BRA

4.2.3.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar

A extração de RNA total foi realizada utilizando kit específico de extração¹⁰, conforme instrução do fabricante. Posteriormente a pureza e a concentração do RNA foram avaliadas por espectrofotometria¹¹, estando a grau de pureza entre 1,7 a 2,0 quando utilizada a razão entre as bandas 260 e 280 e concentração média de 40 ng/μL. Devido ao baixo grau de pureza, (ideal 2,0) optou-se por tratar-se as amostras por meio de digestão de DNA com a enzima DNase, utilizando Kit comercial¹² de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente utilizou-se 7 μL do RNA total para sintetizar o DNA complementar pela técnica de transcriptase reversa utilizando kit comercial para pequenas quantidades¹³ obtendo-se 20 μL de solução total.

4.2.3.2 PCR quantitativo em tempo real por transcriptase reversa (RT- QPCR)

O PCR quantitativo foi realizado de acordo com a técnica previamente descrita por Kabara et al. (2014) utilizando ensaios de expressão gênica da Applied Biosystems, sendo os primes TaqMan foram pre desenhados (TNF-α - Bt 03259156-m1; IL-12- Bt 03213923-m1; IL-10 - Bt 03212727-m1, Applied Biosystem, SP, BRA). As amostras foram analisadas em duplicatas, utilizando 20 ng de DNA por reação (2,5 μL) 10 μL de tampão¹⁴ e 0,5 μL dos respectivos ensaios de expressão gênica¹⁵ em equipamento para qPCR¹⁶. A amplificação de PCR foi realizada em placas óticas de 96 poços. Para as detecções, o equipamento de qPCR foi programado para 2 ciclos iniciais de 2 minutos à 50°C e 10 minutos à 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos à 95°C e finalizando com um ciclo de 1 minuto à 60°C.

¹⁰ RNA Purelink minikit, Life techn., SP, BRA

¹¹ Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE

¹² DNase I grau amplificação Invitrogen Corp., SP, BRA

¹³ Sensiscript RT KIT, Qiagen, SP, BRA

¹⁴ TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, Applied Biosystem, SP, BRA

¹⁵ TaqMan Gene Expression Assay Mix -20x, Applied Biosystem, SP, BRA

¹⁶ 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystem, SP, BRA

A eficiência de reação (E) foi calculada a partir das curvas padrões de cada gene, usando a fórmula $E = e^{(-1/\text{slope})} - 1$. A eficiência de reação para as diferentes citocinas foi IL-12- 88%, IL10- 93%; TNF- α -984%, GAPDH-88%, β actina 91%.

A relativa quantificação de TNF- α , IL-12 e IL-10 foram calculadas utilizando o software 7500 SDS (v.1.3.1). Os resultados foram calculados baseados na razão da expressão relativa de cada gene corrigida pela eficiência da reação (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002), utilizando β actina e GAPDH (Bt-03279174-g1 e Bt 032 109113-g1 respectivamente, Applied Biosystem, SP, BRA) como genes de referência (KABARA et al., 2014; HOLMGREN et al., 2014) e calibrados utilizando a média dos valores obtidos do M1 de cada gene.

4.2.4 Ensaio de função celular

A atividade funcional dos leucócitos sanguíneos foi analisada por meio da mensuração do metabolismo oxidativo basal e estimulado e da fagocitose- aferindo-se a internalização de bactérias marcadas com iodeto de propídeo (*Staphylococcus aureus* –SaPI e *Escherichia coli*- EcPI) pela técnica de citometria de fluxo, conforme as técnicas empregadas por Kampem et al. (2004); Kampem Tollersrud e Lund (2004) e Azedo (2007).

4.2.4.1 Metabolismo oxidativo

O metabolismo oxidativo foi avaliado aferindo-se a indiretamente a produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mensurando-se a oxidação intracelular de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em diclorofluoresceína (DCFH) conforme descrito por Hirabayashiuchi, Tamiuchi e Kobayshi (2006) e Kobzik, Godleski e Brain (1990). Em tubos de polipropileno próprios para citometria de fluxo, incubou-se 100 μ l de sangue total com 200 μ L de DCFH-DA¹⁷ (0,3 mM) em 1.2% solução PBS¹⁸ para a prova basal e com 200 μ L de DCFH-DA¹⁹

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

¹⁸ *Phosphate Buffered Saline* – Tampão Fosfato Salino

¹⁹ Sigma Aldrich, St. Louis, n° cat. D6883

(0,3 mM) em 1.2% solução PBS e 100 µL de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a concentração de 25×10^6 bactérias/mL para a prova estimulada a 37° C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente interrompeu-se a reação com 2 mL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3 mM) e procedeu-se duas lises osmóticas das hemácias com solução salina a 0,2% e a 1,6%, realizando 3 centrifugações após cada etapa (250 g x 8 minutos a 4°C) para a posterior marcação das moléculas de superfície CD14 e CH 138. Após lavagem com PBS, ressuspendeu-se o botão celular com 400 µl de PBS com 10% BSA e realizou-se a leitura em citômetro de fluxo.

4.2.4.2 Fagocitose

Para a realização do ensaio da fagocitose, foi necessária a conjugação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (O98:H28) a iodeto de propídio²⁰ (PI), conforme Hasui, Hirabayashi e Yohnosuke (1989) modificado por Souza (2010). Em tubos de polipropileno próprios para citometria de fluxo, incubou-se 100 µl de sangue total com µL de *Staphylococcus aureus* conjugado a iodeto de propídio (Sa-PI) ou com 100 µL de *Escherichia coli* conjugado a iodeto de propídio (Ec-PI) a concentração de 25×10^6 bactérias/mL a 37° C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente interrompeu-se a reação com 2 mL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3 mM) e procedeu-se duas lises osmóticas das hemácias com solução salina a 0,2% e a 1,6%, realizando centrifugações após cada etapa (250 g x 8 minutos a 4°C) para a posterior marcação das moléculas de superfície CD14 e CH 138. Após lavagem com PBS, ressuspendeu-se o botão celular com 400 µl de PBS com 10% BSA e realizou-se a leitura em citômetro de fluxo.

4.2.4.3. Avaliação da expressão da proteína CD14 e CH 138 em leucócitos sanguíneos

Após as lises osmóticas citadas, nas provas de metabolismo oxidativo e fagocitose,

²⁰ Sigma Aldrich, St. Louis, n° cat. P4170

identificou-se os leucócitos sanguíneos como neutrófilos, por meio da expressão da molécula de superfície CH138 (Tizard 2009), e como monócitos, por meio da expressão da molécula de superfície CD14 (Taraktoglou et al., 2011; Machugh et al., 2012,). Para tal, adicionou-se 0,25 µL do anticorpo monoclonal *mouse* IgG1 *anti-bovine* CD14²¹ e 0,25 µL do anticorpo monoclonal *mouse* IgM *anti-bovine* CH138²² a suspensão celular, incubando os tubos por 30 minutos a temperatura ambiente. Passado o período de incubação, procedeu-se a centrifugação e lavagem dos tubos com 1000 µL de PBS gelado (250 g x 8 minutos a 4°C), adicionando-se 0,25 µL do anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG1²³ conjugado ao fluorocromo (FITC) *isotiocianato de fluoresceína* e 0,25 µL do anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgM²⁴ conjugado ao fluorocromo *Allophycocyanin* (APC) por 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luminosidade. Após centrifugação e lavagem dos tubos com 1000 µL de PBS gelado (250 g x 8 minutos a 4°C), as células foram ressuspensas em 400 µL de PBS contendo 10% BSA e analisadas em citômetro de fluxo.

4.2.4.4 Análise em citometria de fluxo

Os ensaios de fagocitose, metabolismo oxidativo e imunofenotipagem foram analisados por citometria de fluxo em citômetro conectado a um computador com o programa CELLQUEST® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™). Foram analisados 20 mil eventos para os leucócitos sanguíneos, analisadas em *gates* de granulócitos e mononucleares baseado no citograma de granulosidade (SCC – *side scatter*) e tamanho (FSC – *foward scatter*), avaliando-se a porcentagem de células marcadas e a intensidade média de fluorescência por célula em software próprio²⁵ de acordo com Bass et al, (1983); Kobzik, Goedleski e Brain, (1990) (figura 1).

²¹ VMRD, Pulman, EUA, nº cat. MM61A

²² VMRD, Pullman, EUA, nº cat. CH138A

²³ Life, San Diego, CA, USA nº cat. A10530

²⁴ Life, San Diego, CA, USA nº cat. M31505

²⁵ Flow Jo - Treestar – Versão 7.6.1 para Windows

Figura 1- Estratégia de análise de leucócitos sanguíneos de bezerros em citograma

Fonte: (BERTAGNON, 2014)

Legenda: (A) Dot plot dos gates de granulócitos e células mononucleares mostrando nítida dispersão conforme tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (B) Dot plot de células que produziram 2,7-dichlorofluorescein (DCFH) e fagocitaram *Staphylococcus aureus* corado com iodeto de propídio. (C) Dot plot de fagocitaram *Staphylococcus aureus* corado com iodeto de propídio. (D) Histograma representando as células que fagocitaram *Staphylococcus aureus* corado com iodeto de propídio. (E) Dot plot de células que produziram 2,7-dichlorofluorescein (DCFH) na ausência de estímulo. (F) Histograma representando células que produziram 2,7-dichlorofluorescein (DCFH) na ausência de estímulo.

4.2.5 Quantificação das Imunoglobulinas séricas

O soro sanguíneo foi obtido após centrifugação do sangue (3500 rpm X 15 min) e acondicionado em microtubos congelados a -20°C até o processamento das amostras.

A quantificação das imunoglobulinas foi realizada por meio do método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando kit comercial para cada imunoglobulina (IgG1²⁶, IgG2²⁷, IgA²⁸ e IgM²⁹) de acordo com recomendação do fabricante. A determinação da curva e das amostras foi realizada em leitora³⁰ e analisada pelo *Gen5 Data Analysis Software*. Após a determinação da curva os valores obtidos na leitura foram inseridos na fórmula dada pela curva obtendo-se dessa forma o valor das concentrações das imunoglobulinas.

4.2.6 Coleta de lavado broncoalveolar (LBA)

Durante a inspeção indireta por endoscopia, realizou-se o lavado broncoalveolar (LBA). Após a inspeção do aparelho respiratório pelo broncoscopia (videogastrosκόpio flexível⁹), instilou-se através do canal de trabalho 60 mL de Solução Fisiológica estéril, a temperatura ambiente, dividida em três alíquotas. Em seguida esse material foi aspirado pelo próprio canal de trabalho, com auxílio de um aspirador³¹, recuperando aproximadamente 40 mL de LBA.

O material coletado foi acondicionado em dois tubos do tipo *falcon* de 50 mL, sendo um estéril destinado à quantificação de citocinas e outro destinado às demais provas imunológicas (perfil celular, função celular e dosagem de imunoglobulinas). Ambas as alíquotas

²⁶ Bovine IgG1 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc.

²⁷ Bovine IgG2 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc.

²⁷ Bovine IgG2 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc.

²⁸ Bovine IgA ELISA Quantitation Set® – Abnova Laboratories, Inc.

²⁸ Bovine IgA ELISA Quantitation Set® – Abnova Laboratories, Inc.

²⁹ Bovine IgM ELISA Quantitation Set® – Abnova Laboratories, Inc.

²⁹ Bovine IgM ELISA Quantitation Set® – Abnova Laboratories, Inc.

³⁰ Elx808 BioTek

³⁰ Elx808 BioTek

³¹ Aspiramax Suction device compacto MA-520® – NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda.

foram mantidas em banho de gelo até o processamento das amostras, não excedendo um tempo maior que 3 horas, medidas essas tomadas para manter a viabilidade das células recuperadas.

4.2.7 Isolamento da suspensão celular das amostras de LBA

No laboratório, as duas alíquotas de LBA foram centrifugadas (1.000 g X 15 minutos a 4°C), sendo a alíquota estéril processada em fluxo laminar e a não estéril em bancada. Na alíquota não estéril, após a centrifugação, armazenou-se o sobrenadante em microtubos e congelou-se a -20°C para posterior quantificação de imunoglobulinas. O botão celular, conservado na superfície inferior do frasco, foi removido através de aspersão gentil de aproximadamente 10 mL de PBS e novamente centrifugado (400 g X 10 minutos a 4°C). Após desprezar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em um mL de meio de cultivo celular RPMI 1640 enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% (KOESS; HAMANN, 2008), sendo esta suspensão celular utilizada para a avaliação do perfil celular e os ensaios de função celular.

Na alíquota estéril, o botão celular foi lavado novamente em solução de PBS estéril (400 g X 10 minutos a 4°C), ressuspensado em um mL de meio de cultivo celular RPMI 1640 e acondicionado em microtubos estéreis livres de RNase. Centrifugou-se novamente para remoção do meio (10000g x 8 min a 4°C) e dissolveu-se as células em 500 µL de Trizoltm reagente mantendo-as congeladas a -80°C até a análise de RNA, por um período máximo de 2 meses de congelamento.

4.2.8 Viabilidade e concentração celular das amostras de LBA

A suspensão celular foi submetida a contagem celular, realizada na câmara de *Neubauer* utilizando aumento de 40x em microscópio óptico¹⁵, e a viabilidade celular avaliada através da exclusão do azul de *Trypan*, sendo maior que 80% para todas as amostras. Em seguida, a suspensão celular foi ajustada em 2×10^6 células viáveis/mL para a realização das provas

imunológicas.

4.2.9 Perfil celular

Alíquotas de 100 μ L e de 200 μ L da suspensão celular ajustada de LBA foram centrifugadas a 28 x g por 6 minutos em citocentrífuga para confecção de lâminas de microscopia. Os botões celulares foram fixados com metanol e coradas com corante Rosenfeld. A leitura das lâminas foi realizada por microscopia óptica de imersão em aumento de 1000X, classificando-se 300 células de acordo com as características morfológicas em macrófagos, macrófagos gigantes, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e células epiteliais. Utilizou-se como critério de inclusão, momentos em que o animal apresentasse aumento de neutrófilos que ultrapassassem os valores de macrófagos mesmo que os bezerros não apresentassem outras anormalidades no exame físico ou no hemograma.

4.2.10 Ensaio de função celular e análise em citometria de fluxo

A atividade funcional das células broncolaveolares foi realizada de igual maneira a descrita para os leucócitos sanguíneos, diferindo apenas na etapa da lise osmótica, a qual não foi necessária devido à ausência de hemácias nas amostras e na análise da expressão das moléculas de superfície uma vez que não se mensurou a expressão da proteína CH 138. Devido a baixa especificidade deste marcador para neutrófilos broncolaveolares (Batista et al, 2012). A identificação de macrófagos alveolares permaneceu por meio da expressão da molécula CD14 (Taraktoglou et al., 2011; Machugh et al., 2012,)

Os ensaios de fagocitose, metabolismo oxidativo e imunofenotipagem da molécula CD14 foram analisados por citometria de fluxo de igual maneira a descrita para os leucócitos sanguíneos, com pequenas modificações. Devido a não separação de populações celulares de acordo com o citograma de granulosidade (SCC – *side scatter*) e tamanho (FSC – *forward*

scatter), não foi possível classificar as células em granulócitos ou mononucleares, utilizando uma estratégia de *gate* única para avaliação, tal como descrito por Barry et al., (2002); Soethout et al., (2004) e Batista et al., (2012). Além disso, analisou-se entre 5 a 10 mil eventos para as células broncoalveolares, devido à pequena quantidade de células nas amostras (Figura 2).

Figura 2- Estratégia de análise de células broncolaveolares de bezerros em citograma

Fonte: (BERTAGNON, 2014)

Legenda: (A) Dot plot das células broncoalveolares selecionadas mostrando ausência de dispersão nítida conforme tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (B) Dot plot de células que produziram 2,7-dichlorofluorescein (DCFH). (C) Histograma representando as células que produziram 2,7-dichlorofluorescein (DCFH) (D) Dot plot de células que fagocitaram *Staphylococcus aureus* corados com iodeto de propídio (E) Histograma representando células que fagocitaram *Staphylococcus aureus* corados com iodeto de propídio

4.2.11 Quantificação de imunoglobulinas broncoalveolares

A quantificação das imunoglobulinas foi realizada no sobrenadante do LBA, por meio do método de ELISA conforme descrito anteriormente no item 4.3.1.5. Os resultados foram expressos em quantidade absoluta e em porcentagem de cada imunoglobulina no LBA recuperado.

4.2.12 Expressão gênica das citocinas de células broncoalveolares

Estas dosagens foram realizadas de maneira similar à descrita para leucócitos sanguíneos, utilizando os mesmos ensaios de expressão gênica. As únicas diferenças encontradas foram referentes à concentração de cDNA utilizada, sendo possível utilizar 10 ng/ μ L para cada ensaio e as eficiências de reação (E), que foram IL-12 - 80%, IL-10 - 80%; TNF- α - 110%, GAPDH - 82%, β -actina - 80%.

As relativas quantificações das expressões das citocinas foram calculadas da mesma maneira descritas para amostras sanguíneas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico GraphPad InStat[®], versão 3.01 para Windows 95³².

Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Kolmogorov – Smirnov. Quando os dados eram normais, avaliou-se as médias pelo teste de análise de variância *ANOVA One-way (Unstacked)*, comparando-se os momentos entre si pelo teste de Tukey. Para dados que não apresentaram distribuição normal, analisou-se as medianas

³² GraphPad Software, Inc., San Diego California USA

pelo teste de *Mann-Whitney*, comparando os momentos entre si pelo teste de Dunn. Para todos os resultados, foram consideradas significativas as análises que apresentaram $P < 0,05$ e com tendência a diferença as que apresentaram $P \leq 0,1$ aos testes estatísticos acima mencionados (SAMPAIO, 1998).

As análises de correlação entre duas variáveis foram avaliadas pelo teste de coeficiente de correlação de Pearson (r), considerando correlação fraca $r = 0,1$ a $0,3$; moderada $r = 0,4$ a $0,6$ e forte $r = 0,7$ a 1 (SAMPAIO, 1998).

5 RESULTADOS

O estudo procurou identificar influências etárias na maturidade do sistema imunológico do sistema imunológico de bezerros entre 3 a 6 meses de idade. Com intuito de evitar variáveis que pudessem interferir no sistema imunológico, aclimataram-se os bezerros desde os 15 dias de vida, mantendo-os sob o mesmo sistema de manejo e elencaram-se critérios de inclusão para garantir a sanidade dos animais, minimizando assim que outros fatores, que não a idade, influenciassem os resultados analisados pelo estudo.

5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Durante o período experimental os animais foram avaliados periodicamente pelos métodos semiológicos classicamente preconizados por Dirksen; Grunder e Stober (1993), na qual foram realizadas as avaliações das funções vitais constituídas por frequências respiratória e cardíaca, temperatura corporal, movimentos ruminais, estado de hidratação, coloração das mucosas aparentes e palpação de linfonodos não se encontrando alterações nestas variáveis.

Na sequência, estes animais foram submetidos ao exame físico específico do sistema respiratório, não se encontrando manifestações clínicas condizentes com enfermidades, ao empregar os seguintes métodos semiológicos: inspeção direta, palpação, percussão, auscultação, e olfação.

Os valores dos hemogramas também foram utilizados como critério de inclusão amostral e não se encontrou anormalidades nestes parâmetros (SCHALM, 1965; PEIXOTO et al., 2002), estando às médias e desvios padrões das variáveis do hemograma contidos na Tabela 1, verificando-se que estas variáveis não sofreram influência etária.

A inspeção indireta pela endoscopia (Figura 3) revelou secreção mucosa a mucopurulenta em todos os animais pelo menos em um dos momentos experimentais. Diante desta frequente observação, confrontou-se este achado com os demais exames do animal (físico, hemograma e perfil celular broncoalveolar). Nos casos em que a única alteração foi presença de secreção respiratória, os animais foram considerados hígidos naquele momento. Nos momentos em que concomitante ao aumento de secreção no trato respiratório posterior, encontrou-se predomínio de neutrófilos sobre macrófagos alveolares na citologia

broncolaveolar, as amostras de LBA e sangue destes momentos foram retiradas do estudo totalizando a exclusão de quatro amostras (M1, M6 e M7), conforme fluxograma contido na figura 4, que informa o número de animais utilizado conforme o momento estudado. As médias e desvios padrões das variáveis citológicas do LBA dos bezerros hígidos estão contidos na tabela 2, observando que estes dados não sofreram influência etária.

Figura 3– Imagens broncoscópicas de vias respiratórias de bezerros. (A) Região de brônquios límpida. (B) Região de brônquios com secreção mucopurulenta em pequena quantidade. (C) Região de brônquios com secreção mucopulenta em quantidade moderada

Fonte: (BERTAGNON, 2014)

Figura 4 - Fluxograma do número amostral de bezerros hígidos conforme os momentos experimentais – São Paulo – 2014

Fonte: (BERTAGNON, 2014)

Tabela 1- Médias e desvios padrão das variáveis do hemograma dos bezerros conforme a faixa etária- São Paulo-2014

Momentos	Hem (10 ⁶ /μl)	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	CHCM (%)	Leuc (10 ³ /μl)	Neut (10 ³ /μl)	Linf (10 ³ /μl)	Mono (μl)	Eos (μl)	Basof (μl)
M1 (n 8)	8,3 ^a 1,5	10,2 ^a 2,2	29,9 ^a 4,1	34,0 ^a 3,7	34,6 ^a 3,0	8,86 ^a 2,47	2,58 ^a 1,94	6,19 ^a 1,67	196,4 ^a 177,0	29,0 ^a 65,4	0,0 ^a 0,0
M2 (n 10)	8,3 ^a 1,3	9,8 ^a 2,3	28,4 ^a 4,0	35,3 ^a 3,2	34,7 ^a 4,7	9,83 ^a 3,93	4,01 ^a 2,54	5,51 ^a 2,32	331,7 ^a 247,3	38,2 ^a 68,0	19,8 ^a 62,6
M3 (n 10)	8,4 ^a 2,0	9,6 ^a 1,9	29,0 ^a 5,8	34,7 ^a 2,9	33,2 ^a 2,4	8,10 ^a 1,05	1,96 ^a 0,50	5,77 ^a 1,08	305,1 ^a 218,7	36,1 ^a 67,8	0,0 ^a 0,0
M4 (n 10)	8,2 ^a 2,0	9,7 ^a 2,0	28,8 ^a 5,7	35,4 ^a 2,3	33,4 ^a 1,4	9,28 ^a 2,99	2,60 ^a 1,53	6,32 ^a 1,46	219,7 ^a 184,3	114,0 ^a 198	8,3 ^a 26,2
M5 (n 10)	7,7 ^a 2,3	9,2 ^a 2,6	27,2 ^a 6,5	35,9 ^a 4,7	33,7 ^a 2,1	8,84 ^a 3,35	2,80 ^a 1,45	5,71 ^a 1,93	290,2 ^a 330,4	31,1 ^a 40,8	0,0 ^a 0,0
M6 (n 9)	7,8 ^a 1,6	9,0 ^a 1,5	27,7 ^a 4,5	35,6 ^a 3,9	32,4 ^a 1,4	8,64 ^a 1,53	2,54 ^a 0,89	5,59 ^a 1,99	467,2 ^a 242,7	34,8 ^a 62,2	0,0 ^a 0,0
M7 (n 9)	7,7 ^a 1,4	9,6 ^a 1,1	28,6 ^a 3,4	37,4 ^a 4,4	33,6 ^a 1,4	8,09 ^a 2,27	1,80 ^a 1,33	5,96 ^a 1,41	237,3 ^a 127,9	47,7 ^a 87,9	29,1 ^a 92,0

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença $P < 0,05$; n- número de animais utilizado, M1 -90 ± 2 dias de vida, M2-105 ± 2 dias de vida; M3-120 ± 2 dias de vida; M4-135 ± 2 dias de vida M5-150 ± 2 dias de vida M6-165 ± 2 dias de vida M7-180 ± 2 dias de vida; Hem- hemácias, Hb hemoglobina, VCM Volume corpuscular médio, CHCM- concentração média de hemoglobina, leuc leucócitos, Neut neutrófilos segmentados, Linf linfócitos, Mono monócitos, Eos eosinófilos ; Basof basófilos.

Tabela 2- Médias e desvios padrão das populações celulares broncoalveolares dos bezerros hígidos conforme a faixa etária, São Paulo-2014

Citologia	Momentos							
	M1 (n 8)	M2 (n 10)	M3 (n 10)	M4 (n 10)	M5 (n 10)	M6 (n 9)	M7 (n 9)	P
Macrófago (%)	66,10 ^a 8,97	66,26 ^a 13,78	66,51 ^a 11,95	72,25 ^a 16,47	61,40 ^a 13,62	62,24 ^a 12,68	72,99 ^a 12,00	0,30
Macróf gigante (%)	3,80 ^a 1,82	3,90 ^a 2,07	5,59 ^a 3,45	4,31 ^a 2,48	6,23 ^a 4,59	4,95 ^a 2,63	4,70 ^a 3,35	0,58
Neutrófilo (%)	26,08 ^a 9,83	23,84 ^a 16,88	21,85 ^a 14,43	21,83 ^a 17,27	24,09 ^a 17,86	26,56 ^a 15,90	16,87 ^a 14,95	0,86
Linfócitos (%)	3,50 ^a 2,15	3,96 ^a 2,80	4,38 ^a 3,30	2,49 ^a 1,73	4,60 ^a 3,21	4,78 ^a 4,51	2,87 ^a 2,07	0,58
Eosinófilos (%)	0,33 ^a 0,35	0,15 ^a 0,21	0,00 ^a 0,00	0,00 ^a 0,00	0,15 ^a 0,21	0,00 ^a 0,00	0,10 ^a 0,17	0,66
Cel epiteliais (%)	0,75 ^a 0,96	2,65 ^a 2,55	0,86 ^a 0,58	1,84 ^a 2,22	1,71 ^a 2,77	2,78 ^a 2,55	4,50 ^a 7,18	0,35
Relação macrof/neut (%)	3,29 ^a 2,10	5,76 ^a 6,67	5,68 ^a 6,94	5,15 ^a 3,94	10,66 ^a 17,90	5,12 ^a 6,26	5,96 ^a 4,97	0,4

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença $P < 0,05$; n- número de animais utilizado, M1 -90 ± 2 dias de vida, M2-105 ± 2 dias de vida; M3-120 ± 2 dias de vida; M4-135 ± 2 dias de vida M5-150 ± 2 dias de vida M6-165 ± 2 dias de vida M7-180 ± 2 dias de vida.

5.2 AVALIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS: FUNÇÃO E IMUNOFENOTIPAGEM

Nas tabelas 3 e 4 estão os resultados referentes aos ensaios para a avaliação das células mononucleares: expressão da proteína CD14 e suas funções de metabolismo oxidativo e fagocitose, estando dispostos em porcentagem média de células que realizaram cada atividade na tabela 3 e em mediana de intensidade média de fluorescência por célula que realizou cada atividade na tabela 4. Nas tabelas 5 e 6 estão os resultados referentes aos ensaios para a avaliação dos granulócitos por meio da expressão da proteína suas funções de metabolismo oxidativo e fagocitose. Estão dispostos em porcentagem média de células que realizaram cada atividade na tabela 5 e em mediana de intensidade média de fluorescência por célula que realizou cada atividade na tabela 6.

Observou-se que no momento 3 houve um aumento de células mononucleares ($P=0,02$) e tendência a diminuição de granulócitos expressando a molécula CH138 ($P=0,09$) em relação ao M3. Neste mesmo momento houve tendência a aumentar a intensidade média de fluorescência da molécula CD14 ($P=0,05$), sem alteração na porcentagem de células expressando esta molécula (Gráfico 3).

A maioria das funções leucocitária (fagocitose e metabolismo oxidativo) se manteve constante ao longo dos momentos, encontrando-se apenas tendência a aumentar a porcentagem de células $CD14^+$ com metabolismo oxidativo estimulado no M3 e M7 ($P=0,07$) (Gráfico 3) e aumento da intensidade média de fluorescência de células $CH138^+$ no M5, com posterior redução no momento seguinte ($P=0,02$).

As dinâmicas de metabolismo oxidativo basal e estimulado estão contidas no gráfico 1. Observou-se correlação fraca entre as porcentagens de células $CD14^+$ produtoras de ERO basal e estimulada ($r= 0,11$), havendo uma maior atividade para a prova estimulada. As porcentagens de células $CH138^+$ produtoras de ERO eram maiores na prova basal apresentando alta correlação entre as duas provas ($r= 0,891$). As dinâmicas de fagocitose de *S aureus* e *E coli* estão contidas no gráfico 2. A fagocitose de *Staphylococcus aureus* sempre foi maior que a de *E coli*, para os leucócitos sanguíneos $CH138^+$ ($r=0,40$) e para os leucócitos $CD14^+$ ($r=0,68$) tanto em porcentagem (Gráfico 2) como IMF. Verificou-se também que a fagocitose de células $CH138^+$ foi maior que por $CD14^+$.

Tabela 3- Média (erro padrão da média) das porcentagens dos leucócitos sanguíneos mononucleares (MNM) e expressão e funções das células CD14⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Momentos	<u>MNM</u> (%)	CD 14 ⁺ (%)	DCFH bas (%)	DCFH E (%)	<u>SaPI</u> (%)	EcPI (%)
M1	50,56 ^{ab}	26,18 ^a	15,39 ^a	21,79 ^a	20,76 ^a	13,51 ^a
(n 8)	4,60	3,40	3,43	3,75	3,77	3,24
M2	48,4 ^{ab}	25,66 ^a	16,58 ^a	23,01 ^a	21,81 ^a	15,03 ^a
(n 10)	2,22	3,78	2,63	2,69	3,56	3,82
M3	63,1 ^a	27,00 ^a	16,52 ^a	27,79 ^a	24,06 ^a	15,00 ^a
(n 10)	3,37	3,37	2,92	1,79	3,57	3,93
M4	33,3 ^b	29,23 ^a	24,09 ^a	24,92 ^a	19,13 ^a	11,55 ^a
(n 9)	4,22	5,44	3,44	0,99	2,95	2,78
M5	51,7 ^{ab}	24,06 ^a	16,31 ^a	20,66 ^a	19,91 ^a	11,30 ^a
(n 9)	2,62	3,80	2,61	2,48	3,58	1,96
M6	48,03 ^{ab}	21,79 ^a	15,63 ^a	25,20 ^a	17,02 ^a	12,41 ^a
(n 9)	3,22	2,91	2,92	1,93	1,85	2,23
M7	57,79 ^{ab}	22,77 ^a	17,49 ^a	35,42 ^a	17,31 ^a	13,02 ^a
(n 9)	3,86	2,82	2,93	5,3	2,67	1,47
P	0,02	0,8	0,25	0,07	0,2	0,9

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença P<0,05; n- número de animais utilizado, M1 -90 ±2 dias de vida, M2-105±2 dias de vida; M3-120±2 dias de vida; M4-135±2 dias de vida M5-150±2 dias de vida M6-165±2 dias de vida M7-180±2 dias de vida; DCFH bas metabolismo oxidativo basal; DCFH E metabolismo oxidativo estimulado; SaPI fagocitose de *Staphylococcus aureus*; EcPI fagocitose de *E. coli*.

Tabela 4- Medianas (erro padrão da média) das intensidades médias de fluorescência (IMF) da expressão e funções das células CD14⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Momentos	CD 14 ⁺ (IMF)	DCFH bas (IMF)	DCFH E (IMF)	<u>SaPI</u> (IMF)	EcPI (IMF)
M1	64,00 ^a	173,00 ^a	146,50 ^a	358,00 ^a	95,80 ^a
(n 8)	19,72	88,49	94,11	89,78	21,01
M2	66,80 ^a	69,00 ^a	84,70 ^a	119,00 ^a	51,90 ^a
(n 10)	16,24	15,02	41,19	51,46	20,79
M3	100,30 ^a	98,05 ^a	186,50 ^a	204,50 ^a	43,75 ^a
(n 10)	19,47	55,07	61,37	75,01	6,96
M4	65,30 ^a	95,50 ^a	128,00 ^a	126,00 ^a	38,30 ^a
(n 10)	10,98	51,60	19,51	56,67	6,52
M5	31,30 ^a	84,80 ^a	51,15 ^a	235,00 ^a	41,10 ^a
(n 10)	17,73	83,55	57,04	48,74	31,23
M6	36,95 ^a	106,00 ^a	109,00 ^a	187,50 ^a	52,75 ^a
(n 9)	15,91	20,51	24,25	55,75	15,52
M7	53,25 ^a	160,95 ^a	182,00 ^a	262,00 ^a	78,25 ^a
(n 9)	11,61	112,61	69,28	64,31	10,99
P	0,05	0,77	0,44	0,32	0,32

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença P<0,05; n- número de animais utilizado, M1 -90 ±2 dias de vida, M2-105±2 dias de vida; M3-120±2 dias de vida; M4-135±2 dias de vida M5-150±2 dias de vida M6-165±2 dias de vida M7-180±2 dias de vida; DCFH bas metabolismo oxidativo basal; DCFH E metabolismo oxidativo estimulado; SaPI fagocitose de *Staphylococcus aureus*; EcPI fagocitose de *Escherichia coli*.

Tabela 5- Médias (erro padrão da média) das porcentagens da expressão e funções das células CH138⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Momentos	CH138(%)	DCFH bas (%)	DCFH E (%)	SaPI (%)	EcPI (%)
M1	30,98 ^a	91,30 ^a	63,20 ^a	72,53 ^a	24,23 ^a
(n8)	4,37	7,52	5,87	9,14	3,47
M2	37,23 ^a	98,14 ^a	82,98 ^a	81,93 ^a	23,05 ^a
(n 10)	4,07	0,91	2,38	3,51	4,78
M3	27,92 ^a	98,53 ^a	79,17 ^a	83,94 ^a	25,45 ^a
(n 10)	2,94	0,35	5,30	4,04	4,62
M4	40,67 ^a	98,58 ^a	84,36 ^a	72,23 ^a	18,35 ^a
(n 10)	3,61	0,89	5,24	5,46	3,70
M5	31,21 ^a	97,61 ^a	77,74 ^a	71,42 ^a	26,38 ^a
(n 10)	1,52	0,89	13,58	6,32	4,27
M6	38,01 ^a	88,63 ^a	71,57 ^a	68,96 ^a	16,74 ^a
(n 9)	3,27	4,73	9,62	7,13	3,35
M7	27,77 ^a	90,71 ^a	71,43 ^a	66,39 ^a	22,53 ^a
(n 9)	2,69	3,85	6,89	8,89	5,61
P	0,09	0,16	0,41	0,4	0,6

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença $P < 0,05$; n- número de animais utilizado, M1 -90 $\pm$ 2 dias de vida, M2-105 $\pm$ 2 dias de vida; M3-120 $\pm$ 2 dias de vida; M4-135 $\pm$ 2 dias de vida M5-150 $\pm$ 2 dias de vida M6-165 $\pm$ 2 dias de vida M7-180 $\pm$ 2 dias de vida. ; DCFH bas metabolismo oxidativo basal; DCFH E metabolismo oxidativo estimulado; SaPI fagocitose de *Staphylococcus aureus*; EcPI fagocitose de *Escherichia coli*.

Tabela 6- Medianas (erro padrão da média) intensidades médias de fluorescência (IMF) da expressão e funções das células CH138⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014.

Momentos	CH138+ (IMF)	DCFH bas IMF)	DCFH E (IMF)	SaPI (IMF)	EcPI (IMF)
M1	316,00 ^a	736,50 ^a	3147,00 ^{ab}	408,00 ^a	33,65 ^a
(n 8)	115,64	109,65	1003,00	80,72	5,50
M2	173,00 ^a	441,00 ^a	1165,00 ^{ab}	534,00 ^a	44,40 ^a
(n 10)	45,84	151,17	938,95	124,45	9,51
M3	331,00 ^a	427,50 ^a	2309,50 ^{ab}	450,50 ^a	67,50 ^a
(n 10)	83,61	192,62	629,79	100,27	18,42
M4	162,00 ^a	544,00 ^a	2263,00 ^{ab}	212,00 ^a	17,20 ^a
(n 10)	16,14	126,68	216,91	105,26	5,38
M5	226,00 ^a	665,00 ^a	5501,00 ^a	395,00 ^a	19,80 ^a
(n 10)	91,95	139,61	320,96	119,74	5,03
M6	115,00 ^a	401,00 ^a	577,00 ^b	460,00 ^a	40,70 ^a
(n 9)	36,15	92,65	591,27	139,59	8,87
M7	182,00 ^a	867,00 ^a	1517,00 ^{ab}	365,50 ^a	27,75 ^a
(n 9)	86,54	136,32	1247,3	218,48	6,72
P	0,67	0,60	0,02	0,51	0,20

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam de diferença $P < 0,05$; n- número de animais utilizado, M1 -90 $\pm$ 2 dias de vida, M2-105 $\pm$ 2 dias de vida; M3-120 $\pm$ 2 dias de vida; M4-135 $\pm$ 2 dias de vida M5-150 $\pm$ 2 dias de vida M6-165 $\pm$ 2 dias de vida M7-180 $\pm$ 2 dias de vida; DCFH bas metabolismo oxidativo basal; DCFH E metabolismo oxidativo estimulado; SaPI fagocitose de *Staphylococcus aureus*; EcPI fagocitose de *Escherichia coli*.

Gráfico 1 - Metabolismo oxidativo basal e estimulado de leucócitos CD14⁺ sanguíneos e de CH138 sanguíneos expresso em porcentagem (média e erro padrão da média), de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Legenda: Correlação de Pearson de metabolismo oxidativo $r=0,11$ para leucócitos CD14 e $r=0,89$ para leucócitos CH138

Gráfico 2 - Porcentagem (média e erro padrão da média) de fagocitose de *Staphylococcus aureus* (SaPI) e *E coli* (EcPI) por leucócitos CD14⁺ sanguíneos e de CH138 sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Legenda: Correlação de Pearson de fagocitose de *S aureus* $r=0,68$ para leucócitos CD14 e $r=0,40$ para leucócitos CH138

Gráfico 3- Expressão e o metabolismo oxidativo estimulado (DCFH E) das células sanguíneas CD14+ de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Legenda: As intensidades médias de fluorescências IMF estão expressas em mediana e erro padrão da média e as porcentagens em média e erro padrão da média, * Indica tendência a diferença para IMF CD14⁺ (P=0,05), ** indica tendência para IMF de DCFH E (P=0,07)

5.3 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS BRONCOLAVEOLARES: FUNÇÃO E IMUNOFENOTIPAGEM

Nas tabelas 7 e 8 estão os resultados referentes aos ensaios para a avaliação das células mononucleares: expressão da proteína CD14 e suas funções de metabolismo oxidativo e fagocitose, estando dispostos em porcentagem média de células que realizaram cada atividade na tabela 7 e em mediana de intensidade média de fluorescência por célula que realizou cada atividade na tabela 8.

Tabela 7- Médias (erro padrão da média) das porcentagens da expressão e funções das células broncolaveolares CD14⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Momentos	CD 14 ⁺ (%)	DCFH bas (%)	DCFH E (%)	SaPI ₁ (%)	EcPI (%)
M1	25,63 ^a	12,00 ^{ab}	16,91 ^{ab}	15,17 ^a	9,96 ^a
(n 8)	4,35	2,72	4,39	2,31	3,23
M2	41,36 ^{ab}	25,80 ^a	22,51 ^{ab}	28,55 ^b	16,97 ^{ab}
(n 10)	5,07	3,17	5,27	2,68	2,72
M3	44,33 ^b	21,29 ^a	21,31 ^{ab}	29,30 ^b	22,44 ^b
(n 10)	2,65	2,78	3,05	3,84	2,72
M4	38,55 ^{ab}	20,74 ^a	27,6 ^{ab}	26,45 ^b	17,68 ^{ab}
(n 9)	5,70	4,06	6,56	3,86	2,16
M5	34,55 ^a	12,19 ^b	33,35 ^a	26,90 ^b	10,74 ^a
(n 9)	2,04	0,98	4,92	2,23	2,07
M6	32,75 ^{ab}	10,14 ^b	21,19 ^{ab}	24,28 ^b	10,77 ^a
(n 9)	4,67	1,74	2,89	3,44	2,25
M7	42,48 ^{ab}	20,5 ^{ab}	11,72 ^b	31,30 ^b	18,26 ^{ab}
(n 9)	6,42	3,59	3,92	3,94	5,13
P	0,04	0,001	0,04	0,001	0,009

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam de diferença P<0,05; n- número de animais utilizado, M1 -90 ±2 dias de vida, M2-105±2 dias de vida; M3-120±2 dias de vida; M4-135±2 dias de vida M5-150±2 dias de vida M6-165±2 dias de vida M7-180±2 dias de vida; DCFH bas metabolismo oxidativo basal; DCFH E metabolismo oxidativo estimulado; SaPI₁ fagocitose de *Staphylococcus aureus*; Ecpi fagocitose de *E coli*.

Tabela 8- Medianas (erro padrão da média) intensidades médias de fluorescência (IMF) da expressão e funções das células broncoalveolares CD14⁺ (fagocitose e metabolismo oxidativo basal e estimulado) de bezerros, conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Momentos	CD 14 ⁺ (IMF)	DCFH bas (IMF)	DCFH E (IMF)	SaPI ₁ (IMF)	EcPI (IMF)
M1	40,57 ^a	84,65 ^a	56,45 ^a	26,85 ^a	10,45 ^a
(n 8)	9,32	74,97	13,88	26,80	40,88
M2	32,60 ^a	503,00 ^{ab}	56,25 ^a	36,6 ^a	13,4 ^a
(n 10)	5,02	126,01	26,48	34,86	1,50
M3	19,90 ^a	1061,00 ^b	98,25 ^a	22,55 ^a	10,85 ^a
(n 10)	13,55	126,05	20,77	6,90	54,46
M4	19,10 ^a	759,00 ^{ab}	77,45 ^a	14,30 ^a	8,29 ^a
(n 9)	3,29	195,80	24,41	23,59	4,17
M5	9,32 ^a	357,00 ^{ab}	98,05 ^a	45,0 ^a	7,69 ^a
(n 9)	5,18	228,73	27,49	29,27	3,29
M6	23,60 ^a	13300 ^{ab}	54,80 ^a	163 ^a	10,3 ^a
(n 9)	3,47	135,37	19,34	67,38	3,26
M7	24,00 ^a	406,00 ^{ab}	32,01 ^a	17,4 ^a	9,72 ^a
(n 9)	3,76	87,42	7,68	22,02	92,5
P	0,39	0,01	0,16	0,08	0,8

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam de diferença P<0,05; n- número de animais utilizado, M1 -90 ±2 dias de vida, M2-105±2 dias de vida; M3-120±2 dias de vida; M4-135±2 dias de vida M5-150±2 dias de vida M6-165±2 dias de vida M7-180±2 dias de vida; DCFH bas metabolismo oxidativo basal; DCFH E metabolismo oxidativo estimulado; SaPI₁ fagocitose de *Staphylococcus aureus*; EcPI fagocitose de *E. coli*.

Observou-se um aumento da porcentagem de células CD14⁺ no M3 em comparação aos momentos M1 e M5 (P= 0,04), sem influência etária na IMF.

Estas células tiveram seu metabolismo basal aumentado no M2, M3 e M4 em relação aos momentos M5 e M6 (P= 0,001) em porcentagem e no M3 em relação ao M1 em IMF (0,01).

No metabolismo oxidativo estimulado, as células do M5 foram capazes de produzir ERO, em quantidades semelhantes ao M2, M3 e M4, mas superiores ao M7 quando analisada a porcentagem, sem influência etária para a variável IMF. As dinâmicas de metabolismo oxidativo basal e estimulado estão contidas no gráfico 4. Observou-se fraca correlação entre as porcentagens de células CD14⁺ produtoras de ERO basal e estimulada (r= 0,16).

Observou-se um aumento da porcentagem de fagocitose de *Staphylococcus aureus* por células CD14⁺ em todos os momentos em comparação ao M1 e tendência a aumentar a IMF nos M5 e M6. Quando avaliada a porcentagem de células CD14⁺ fagocitando *E coli*, observou-se um aumento no M3 em relação aos M1, M5 e M6 e nenhuma influência na IMF. A fagocitose de *S aureus* sempre foi maior que a de *E coli*, tanto em porcentagem (Gráfico 5) como IMF, havendo uma correlação moderada entre a fagocitose destas duas bactérias (r= 0,68).

Ao correlacionar-se as análises, evidenciou-se maior atividade de fagocitose e expressão de CD 14⁺ no M3, havendo correlação forte e significativa entre expressão de CD14 e fagocitose de *S aureus* (r=0,91, p=0,003), seguido por correlação entre CD14 e fagocitose de *E coli* (r=0,91, p=0,004) e maior atividade de metabolismo oxidativo estimulado no M5, sem correlação com as demais variáveis, ilustrado no gráfico 6.

Gráfico 4- Porcentagem (média e erro padrão da média) do metabolismo oxidativo basal e estimulado de células broncolaveolares CD14⁺ de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Legenda: Correlação de Pearson entre metabolismo oxidativo $r=0,16$; * indica diferença para metabolismo oxidativo estimulado, ** indica diferença para metabolismo oxidativo basal $P<0,05$

Gráfico 5- Porcentagem (média e erro padrão da média) de células CD14⁺ broncolaveolares realizando fagocitose de *Staphylooccus aureus* (SaPI) e *Escherichia coli* (EcPI), $r=0,68$, de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Legenda: Correlação de Pearson entre fagocitose de *S. aureus* e *E. coli* $r=0,68$, * Indica diferença para fagocitose de SaPI, ** indica diferença para fagocitose de EcPI, $P<0,05$

Gráfico 6- Expressão (média e erro padrão da média) da molécula CD14 e suas funções de metabolismo oxidativo estimulado (DCFH E), fagocitose de *Saphylococcus aureus* (SaPI) e *Escherichia coli* (EcPI) de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo- 2014

Legenda: * Indica diferença para CD14⁺ (P=0,04), SaPI (P=0,01) e EcPI (P=0,009) ** indica diferença para DCFH E (P=0,04)

5.4 DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINAS

Na tabela 9 e 10 estão os valores médios e os desvios padrões das diferentes classes de imunoglobulinas séricas IgM, IgA, Ig total e suas sub classes IgG1 e IgG2 expressas em mg/dL e em porcentagem respectivamente. Não houve influencia etária para estas variáveis, notando-se que desde o primeiro momento, os teores de IgG1 superam os de IgG2.

Tabela 9- Médias (erro padrão da média) das dosagens séricas das imunoglobulinas IgG total, IgG1, IgG2, IgA e IgM de bezerros conforme faixa etária, São Paulo- 2014.

Igs	Momentos							P
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
	(n 8)	(n 10)	(n 10)	(n 10)	(n 10)	(n 9)	(n 9)	
Ig Total (mg/dL)	6176,95 ^a 983,60	5074,12 ^a 1094,00	3925,04 ^a 707,40	5020,61 ^a 1009,3	4219,82 ^a 868,48	3910,08 ^a 741,08	3355,15 ^a 650,76	0,30
IgG1 (mg/dL)	5299,44 ^a 957,97	4491,44 ^a 1040,00	3390,69 ^a 652,26	4201,70 ^a 761,21	3572,34 ^a 882,78	3234,53 ^a 609,08	2909,27 ^a 555,59	0,38
IgG2 (mg/dL)	655,00 ^a 151,85	414,49 ^a 83,91	418,96 ^a 76,86	546,82 ^a 192,44	508,25 ^a 134,05	481,41 ^a 131,36	362,85 ^a 64,03	0,70
IgM (mg/dL)	139,42 ^a 28,88	121,73 ^a 36,76	126,30 ^a 17,58	161,15 ^a 41,46	120,09 ^a 17,83	107,15 ^a 12,55	118,60 ^a 19,40	0,86
IgA (mg/dL)	6,87 ^a 0,77	6,37 ^a 0,43	7,30 ^a 0,63	8,06 ^a 1,37	19,13 ^a 7,69	10,89 ^a 3,73	12,44 ^a 3,78	0,15

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença, P<0,05, n- número de animais utilizado, M1 -90 ±2 dias de vida, M2-105±2 dias de vida; M3-120±2 dias de vida; M4-135±2 dias de vida M5-150±2 dias de vida M6-165±2 dias de vida M7-180±2 dias de vida.

Tabela 10- Médias (erro padrão da média) das porcentagens das imunoglobulinas séricas IgG1, IgG2, IgA e IgM e razão entre IgG1/IgG2 de bezerros conforme faixa etária, São Paulo -2014.

Igs	Momentos							P
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
	(n 8)	(n 10)	(n 10)	(n 10)	(n 10)	(n 9)	(n 9)	
IgG1/IgG2 (%)	9,39 ^a 1,91	11,17 ^a 2,97	9,57 ^a 1,49	8,97 ^a 1,93	10,85 ^a 3,06	10,55 ^a 2,91	8,90 ^a 1,78	0,98
IgG1 (%)	83,19 ^a 3,67	84,42 ^a 3,63	85,13 ^a 2,24	81,35 ^a 3,98	78,84 ^a 5,04	82,59 ^a 3,1	82,29 ^a 3,18	0,97
IgG2 (%)	13,15 ^a 3,55	12,17 ^a 3,28	11,17 ^a 1,98	13,10 ^a 4,24	15,56 ^a 4,67	12,50 ^a 2,81	12,49 ^a 2,55	0,98
IgM (%)	3,52 ^a 1,28	3,21 ^a 0,73	3,47 ^a 0,4	5,29 ^a 2,5	4,60 ^a 1,4	4,60 ^a 1,46	4,73 ^a 1,83	0,9
IgA (%)	0,14 ^a 0,03	0,21 ^a 0,06	0,23 ^a 0,03	0,26 ^a 0,09	0,48 ^a 0,26	0,30 ^a 0,06	0,50 ^a 0,14	0,29

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença P<0,05, n- número de animais utilizado, M1 -90 ±2 dias de vida, M2-105±2 dias de vida; M3-120±2 dias de vida; M4-135±2 dias de vida M5-150±2 dias de vida M6-165±2 dias de vida M7-180±2 dias de vida.

5.5 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS BRONCOALVEOLARES

Nas tabelas 11 e 12 estão os valores médios e os desvios padrões das imunoglobulinas séricas e suas diferentes classes de IgM, IgA, IgG1 e IgG2 expressas em ng/mL e em porcentagem respectivamente. Notou-se um aumento contínuo da secreção de IgG1 até o M6, sendo estes teores diferentes dos momentos iniciais (M1, M2 e M3) quando analisados os valores absolutos e com tendência ao aumento quando analisadas as porcentagens. Para as demais variáveis não houve influência etária significativa, apesar de haver um equilíbrio entre os teores absolutos de IgG1 e IgG2 nos momentos M2, M3, e M4, com posterior predomínio de IgG1 havendo tendência a aumentar a fração IgG1/IgG2 no M6, com posterior equilíbrio entre as duas variáveis. A IgA sempre foi a imunoglobulina predominante da região broncoalveolar.

Tabela 11- Médias (erro padrão da média) das dosagens das imunoglobulinas broncoalveolares Ig total, IgG1, IgG2, IgA e IgM de bezerros conforme faixa etária, São Paulo-2014

Igs	Momentos							P
	M1 (n 8)	M2 (n 10)	M3 (n 10)	M4 (n 10)	M5 (n 10)	M6 (n 9)	M7 (n 9)	
Ig T (mg/L)	41,04 ^a	34,55 ^a	43,86 ^a	55,88 ^a	46,29 ^a	50,46 ^a	49,75 ^a	0,73
	1,44	1,96	1,86	3,99	2,56	2,53	2,57	
IgG1 (mg/L)	3,18 ^a	2,63 ^a	3,42 ^a	6,24 ^{ab}	5,29 ^{ab}	9,62 ^b	5,29 ^{ab}	0,005
	1,16	0,73	0,84	1,19	1,05	2,15	1,45	
IgG2 (mg/L)	1,83 ^a	2,81 ^a	4,26 ^a	7,78 ^a	3,53 ^a	2,87 ^a	4,40 ^a	0,66
	0,56	1,29	1,38	3,39	1,82	0,916	2,05	
IgM (mg/L)	0,16 ^a	0,15 ^a	0,18 ^a	0,24 ^a	0,27 ^a	0,27 ^a	0,24 ^a	0,4
	0,05	0,05	0,04	0,04	0,06	0,07	0,05	
IgA (mg/L)	35,86 ^a	28,95 ^a	35,99 ^a	41,42 ^a	37,19 ^a	37,69 ^a	39,82 ^a	0,9
	8,24	5,92	6,34	9,40	7,44	9,72	10,84	
Relação IgG1/IgG2	1,74 ^a	0,94 ^a	0,80 ^a	0,80 ^a	1,50 ^a	3,35 ^a	1,20 ^a	0,09
	0,48	0,24	1,68	0,09	2,61	0,8	1,35	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam de diferença, $P < 0,05$, n- número de animais utilizado, M1 -90 $\pm$ 2 dias de vida, M2-105 $\pm$ 2 dias de vida; M3-120 $\pm$ 2 dias de vida; M4-135 $\pm$ 2 dias de vida M5-150 $\pm$ 2 dias de vida M6-165 $\pm$ 2 dias de vida M7-180 $\pm$ 2 dias de vida.

Tabela 12- Médias (erro padrão da média) das porcentagens das imunoglobulinas broncoalveolares IgG1, IgG2, IgA e IgM de bezerros conforme faixa etária, São Paulo-2014

Igs	Momentos							P
	M1 (n 8)	M2 (n 10)	M3 (n 10)	M4 (n 10)	M5 (n 10)	M6 (n 9)	M7 (n 9)	
IgG1 (%)	8,68 ^a	6,62 ^a	10,74 ^a	12,50 ^a	11,90 ^a	28,78 ^a	16,78 ^a	0,1
	3,28	3,88	2,64	3,4	2,88	5,68	4,66	
IgG2 (%)	5,60 ^a	8,94 ^a	10,51 ^a	15,82 ^a	6,54 ^a	9,89 ^a	8,34 ^a	0,64
	1,72	3,59	3,6	6,75	2,25	3,93	2,86	
IgM (%)	0,39 ^a	0,58 ^a	0,48 ^a	0,43 ^a	0,76 ^a	0,66 ^a	0,53 ^a	0,64
	0,08	0,17	0,11	0,05	0,25	0,21	0,08	
IgA (%)	84,80 ^a	80,17 ^a	79,88 ^a	70,39 ^a	79,52 ^a	65,51 ^a	74,34 ^a	0,40
	4,63	6,35	5,45	8,37	3,31	8,79	5,23	
Relação IgG1/IgG2	2,13 ^a	1,72 ^a	2,69 ^a	2,75 ^a	3,06 ^a	5,41 ^a	3,22 ^a	0,4
	0,62	0,44	1,42	1,17	1,13	1,87	1,11	

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística $P < 0,05$, n- número de animais utilizado, M1 -90 $\pm$ 2 dias de vida, M2-105 $\pm$ 2 dias de vida; M3-120 $\pm$ 2 dias de vida; M4-135 $\pm$ 2 dias de vida M5-150 $\pm$ 2 dias de vida M6-165 $\pm$ 2 dias de vida M7-180 $\pm$ 2 dias de vida.

5.6 EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS

Na tabela 9 e gráficos 7, 8 e 9 estão dispostas as medianas e desvio padrões das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Os valores estão expressos pelo *ratio* (calculados baseados na proporção entre o *threshold cycle* (Ct) de cada gene alvo e os genes referencias (β actina e GAPDH), corrigidos pela eficiência da reação). Verificou-se um aumento gradual da IL-12, significativa no momento 5 com redução no momento posterior ($P=0,04$) e tendência a aumentar a expressão de IL-10 no M6 ($P=0,09$). Já a expressão gênica de TNF- α se manteve constante nos leucócitos sanguíneos.

Tabela 13- Medianas (erro padrão da média) das interleucinas sanguíneas (razão entre mRNA citocinas alvo- IL-10, IL-12 e TNF- α em relação ao mRNA dos genes referencias- GAPDH e β actina).

Momentos								
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	
IL-10	0,11 ^a	0,03 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a	0,06 ^a	0,11 ^a	0,04 ^a	0,09
	0,13	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,02	
IL-12	0,18 ^{ab}	0,09 ^{ab}	0,1 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,29 ^a	0,05 ^b	0,10 ^{ab}	0,04
	0,05	0,02	0,05	0,02	0,07	0,0006	0,05	
TNF-α	0,23 ^a	0,16 ^a	0,25 ^a	0,26 ^a	0,25 ^a	0,28 ^a	0,29 ^a	0,33
	0,03	0,04	0,04	0,05	0,09	0,04	0,07	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença $P < 0,05$, n- número de animais utilizado, M1 -90 $\pm$ 2 dias de vida, M2-105 $\pm$ 2 dias de vida; M3-120 $\pm$ 2 dias de vida; M4-135 $\pm$ 2 dias de vida M5 150 $\pm$ 2 dias de vida M6-165 $\pm$ 2 dias de vida M7-180 $\pm$ 2 dias de vida. * indica diferença estatística $P \leq 0,05$.

Gráfico 7- Blox plot da expressão gênica da IL-10 por leucócitos sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014

Legenda: Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento. Box representa 25-75 quartis.

Gráfico 8- Blox plot da expressão gênica da IL-12 por leucócitos sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014. Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento. Box representa 25-75 quartis.

Legenda: Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento. Box representa 25-75 quartis; * Indica diferença $P=0,04$

Gráfico 9- Blox plot da expressão gênica de TNF- α por leucócitos sanguíneos de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014

Legenda: Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento.

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS DAS CÉLULAS BRONCOALVEOLARES

Na tabela 14 e gráficos 10, 11 e 12 estão dispostas as medianas e desvio padrões das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Os valores foram calculados baseados na proporção entre o *threshold cycle* (Ct) de cada gene alvo e os genes referencias (β actina e GAPDH), corrigidos pela eficiência da reação. Verificou-se um aumento gradual da IL-12, significativo no momento 5 com redução no momento posterior (P=0,04) e tendência a aumentar a expressão de IL-10 no M6 (P=0,09). Já a expressão gênica de TNF- α se manteve constante nos leucócitos sanguíneos.

Tabela 14- Medianas e desvios padrões das interleucinas das células broncoaleolares (razão entre mRNA citocinas alvo- IL-10, IL-12 e TNF- α em relação ao mRNA dos genes referencias- GAPDH e β actina).

Momentos								
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	(n 8)	
IL-10	0,15 ^a	0,08 ^a	0,11 ^a	0,20 ^a	0,13 ^a	0,24 ^a	0,14 ^a	0,1
	0,017	0,071	0,096	0,078	0,043	0,027	0,144	
IL-12	0,0007 ^{ab}	0,0004 ^{ab}	0,0003 ^{ab}	0,0007 ^{ab}	0,010 ^b	0,0003 ^a	0,0007 ^{ab}	0,049
	0,0017	0,0004	0,0008	0,0009	0,01	0,0003	0,0002	
TNF-α	0,015 ^a	0,011 ^a	0,009 ^a	0,010 ^a	0,04 ^b	0,008 ^a	0,011 ^a	0,003
	0,005	0,004	0,002	0	0,009	0,008	0,005	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença P<0,05, n- número de animais utilizado, M1 -90 $\pm$ 2 dias de vida, M2-105 $\pm$ 2 dias de vida; M3-120 $\pm$ 2 dias de vida; M4-135 $\pm$ 2 dias de vida M5 150 $\pm$ 2 dias de vida M6-165 $\pm$ 2 dias de vida M7-180 $\pm$ 2 dias de vida. * indica diferença estatística P $\leq$ 0,05.

Gráfico 10- Blox plot da expressão gênica da IL-10 por células broncoalveolares de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014

Legenda: Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento

Gráfico 11- Blox plot da expressão gênica da IL-12 por células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014

Legenda: Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento, * Indica diferença $P < 0,05$

Gráfico 12- Blox plot da expressão gênica da TNF- α por células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária, São Paulo-2014

Legenda: Barras horizontais em cada box indica mediana (erro padrão da média) para cada momento, * Indica diferença $P < 0,05$

As dinâmicas das expressões gênicas das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α de leucócitos sanguíneos e células broncoalveolares estão dispostas nos gráficos 13, 14 e 15. Observou-se que a citocina IL-10 foi mais expressa por células da região broncoalveolar que leucócitos sistêmicos, mostrando uma moderada correlação entre os dois locais de expressão, não significativa ($r=0,55$; $P= 0,17$), enquanto que as citocinas IL-12 e TNF- α foram mais expressa por leucócitos sanguíneos. Não encontrou-se correlação entre os dois locais de expressão da citocina TNF- α ($r=0,05$), e evidenciou-se uma forte correlação para a expressão da IL-12, sendo significativa ($r=0,85$, $p=0,01$).

Gráfico 13- Dinâmica da expressão gênica da citocina IL-10 (mediana e erro padrão da média) de leucócitos sanguíneos e células broncoalveolares de bezerros conforme a faixa etária São Paulo – 2014

Gráfico 14- Dinâmica da expressão gênica da citocina IL-12 (mediana e erro padrão da média) de leucócitos sanguíneos e células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária São Paulo-2014

Legenda: A expressão de IL12 por células broncolaveolares foi multiplicado por 100, * indica diferença para expressão no sange e no LBA $P < 0,05$.

Gráfico 15- Dinâmica da expressão gênica da citocina TNF- α (mediana e erro padrão da média) de leucócitos sanguíneos e células broncolaveolares de bezerros conforme a faixa etária São Paulo-2014

Legenda: A expressão de TNF- α por células broncolaveolares foi multiplicado por 10, * indica diferença para expressão no sange e no LBA $P < 0,05$.

Ao analisar as dinâmicas das citocinas sanguíneas com os achados significantes da função celular (Gráfico 16), verificou-se aumento do metabolismo oxidativo estimulado (IMF) de células CH138⁺ e de células CD14⁺ (%) sanguíneas e aumento de IL-12 no M5 (150 ± 2 dias de vida), apenas havendo correlação positiva entre IL-12 e produção de ERO por granulócitos ($r=0,99$, $p=0,001$). No momento seguinte, M6 (165 ± 2 dias de vida) observou-se redução desta resposta quando houve aumento de IL-10, porém não se encontrou relação com as secreções dos isotipos IgG1 e IgG2 conforme a faixa etária, havendo predomínio do isótopo IgG1 em todos os momentos, nem com as atividades de fagocitose.

Gráfico 16- Dinâmica da expressão gênica das citocinas IL-10 e IL-12 de leucócitos sanguíneos, intensidade média de fluorescência do metabólitos oxidativo estimulado de leucócitos sanguíneos CH138 (DCFH E CH138) e porcentagem do metabolismo oxidativo estimulado de leucócitos CD14⁺ (DCFH E CD14), de bezerros conforme a faixa etária São Paulo-2014.

Legenda: As citocinas foram expressas em mediana e erro padrão da média do ratio em log 10, a IMF do metabolismo oxidativo de CH 138 expresso em medianas e erro padrão da média de números arbitrários em log de 100 e o metabolismo oxidativo de CD 14 expresso em média e erro padrão da média da porcentagem; * indica diferença para IL- 12 e DCFH E CH138 e DCFH E CD14, $p<0,05$

Ao analisar as dinâmicas das funções celulares e as expressões gênicas da citocinas da região broncoalveolar não encontrou-se correlação para as variáveis fagocitose (SaPI e EcPI), metabolismo oxidativo basal e expressão da molécula CD 14 com as citocinas, uma vez que os ensaios de função mostraram aumento no M3 principalmente (Gráfico 6) e as citocinas nos momentos M5 e M6 (Tabela 14).

Encontrou-se correlação moderada e não significativa entre a expressão gênica de TNF- α e metabólitos oxidativo estimulado ($r= 0,62$, $P=0,13$), forte e com tendência a diferença entre citocinas entre a expressão gênica de IL-12 e metabólitos oxidativo estimulado ($r= 0,70$, $P=0,08$) e forte e positiva entre a expressão gênica de IL-10 e a produção de IgG1 ($r= 0,80$, $P=0,03$), notando-se no M5 (150 ± 2 dias de vida) aumento de IL-12 ($P=0,04$), TNF- α ($P= 0,003$), metabolismo oxidativo estimulado ($P=0,04$) e equilíbrio entre produção de IgG1 e IgG2 ($IgG1/IgG2= 1,5$; Tabela 12). No momento seguinte, (165 ± 2 dias de vida) houve tendência a aumento da expressão gênica de IL-10 ($P=0,1$) e aumento de IgG1 ($P=0,005$), resultando um desequilíbrio entre IgG1 e IgG2 ($IgG1/IgG2=3,35$, $P=0,09$ Tabela 11), conforme visualizado no gráfico 17.

Gráfico 17- Dinâmica da expressão gênica das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , metabólitos oxidativo estimulado de células CD14⁺ (DCFH E) e IgG1 da região broncolaveolar de bezerros, conforme a faixa etária São Paulo-2014.

Legenda: As citocinas foram expressas em mediana e erro padrão da média do ratio, o metabolismo oxidativo de CD 14 e IgG1 foram expressos em médias e erro padrão da média das porcentagens **indica diferença para DCFH E, IL-12 e TNF- α P<0,05, * Indica diferença para IgG1 P<0,05.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho verificou uma identidade própria imunológica respiratória em bezerros durante o período de três a seis meses de idade, momento crítico para o estabelecimento de sua resposta imunitária independente de fatores maternos (CORTESE, 2009).

Foi possível caracterizar esta resposta como predominantemente citotóxica, com progressiva reatividade, que atingiu seu ápice aos 150 dias de vida. Posteriormente verificou-se uma atividade regulatória ou humoral seguida por um equilíbrio entre as duas respostas. Este aumento de citotoxicidade aos 150 dias de vida corrobora com os achados de Grell et al. (2005a,b) e Platt et al. (2009), que evidenciaram um período de maior gravidade de broncopneumonias em bezerros desta faixa etária em comparação a animais mais novos ou mais velhos, sugerindo que possa existir resposta imunológica desenfreada neste período.

Abordado sobre o aspecto epidemiológico, os achados da presente pesquisa também estão de acordo com os dados de Snowden et al. (2006) e Gorden e Plummer (2010) ao relacionarem uma maior letalidade de bezerros por broncopneumonia entre três a cinco meses de idade.

Apesar das evidências que o período de estabelecimento de imunidade própria impacta a defesa pulmonar (GRELL et al., 2005 a,b; MEYER; DEPLANCHE; SCHELCHER, 2008; PLATT et al., 2009), a atividade imune do indivíduo hígido, portanto basal, não é estudada e suas variações fisiológicas não são descritas.

Por mais que as condições de doença sejam controladas em desafios experimentais, existe uma diversidade de respostas atribuídas a características do inócuo, relacionadas à dose e patogenicidade que podem não mimetizar uma infecção natural (KALINA; WOOLUMS; GERSHWIN, 2005). Além disso, os estudos são de curta duração e não permitem verificar uma dinâmica de resposta em períodos maiores que um mês, quiçá durante o segundo trimestre de vida dos bezerros, momento em que os animais ainda são muito susceptíveis a afecção respiratória (GONÇALVES et al., 2000, SNOWDER et al., 2006; GORDEN; PLUMMER, 2010; ACKERMAN, DERSCHIED; ROTH, 2010).

Por isso convencionou-se realizar um estudo longitudinal que acompanhasse indivíduos sadios e submetidos à adequada transferência de imunidade passiva durante o período de estabelecimento de imunidade própria (CORTESE, 2009). É neste momento que

os animais têm competência para resposta vacinal, mas também uma resposta de perfil próprio e mais severo quando acometido por enfermidades respiratórias (GRELL et al., 2005 a,b; PLATT et al., 2009) independente da pressão de infecção ou mesmo manejo.

Trabalhou-se com grupos homogêneos, submetidos ao mesmo manejo alimentar e de higiene. Os bezerros foram adaptados desde os 15 dias de vida e submetidos aos fatores de estresse comuns a criação de bezerros, anterior ao período estudado para evitar perturbação do sistema imune por estresse (RAIDAL et al., 1997; ISHIZAKI; HANAFUSA; KARIYA, 2005; BERTAGNON et al., 2011; BELLINAZZI et al., 2013).

6.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Outro aspecto importante considerado foi a garantia da higidez dos animais. O exame físico geral, hemograma e o exame físico específico do trato respiratório, em particular a auscultação pulmonar, nem sempre são precocemente elucidativos de uma doença respiratória. O diagnóstico definitivo de afecções respiratórias requer exames complementares mais específicos como radiografia, broncoscopia ou análises citológicas e microbiológicas do trato respiratório (GONÇALVES et al., 2004; POULSEN; MCGUIRK, 2009; BENESI et al., 2012).

Desta maneira adotou-se como exames complementares a broncoscopia e a citologia broncoalveolar, que identificaram alterações no trato respiratório em alguns momentos, apesar dos achados dos demais exames (físico geral, hemograma e o exame físico específico) serem compatíveis com os de animais hígidos.

Com frequência encontrou presença de secreção respiratória durante exame broncoscópico nos animais em diversos momentos, o que gerou dúvida quanto ao real estado de saúde dos bezerros. Ao ponderar o manejo a que os animais foram submetidos, constituído por camas de maravalha e alimentação que incluía feno, acredita-se que partículas inaladas originadas destes materiais causaram constante irritação da região traqueobrônquica e consequente resposta fisiológica de produção de muco para eliminá-los por depuração mucociliar (ALBERTIS et al., 2002; GONÇALVES e FEITOSA 2014).

Quando este mecanismo funcionou adequadamente, não houve necessidade de influxo neutrofílico para o local, mantendo a citologia com predomínio de macrófagos (GONÇALVES et al., 2004; GRIFFEN et al., 2010; BENESI et al., 2012) e por isso, nestes momentos os animais foram considerados hígidos. Quando a população de neutrófilo superou os valores de macrófagos alveolares, identificados pelo perfil celular do LBA, optou-se por remover estes momentos do estudo, pois esta resposta foi deflagrada por uma comunicação celular mediada principalmente por citocinas, que promovem também alteração de função celular (VARELLA, FORTES, 2001, KIDD, 2003; TIZARD, 2009) variáveis alvo do estudo.

Os valores de hemograma estavam dentro dos parâmetros estabelecidos por Schalm (1965) e Peixoto et al. (2002). George, Snipes e Lane (2010) atualizaram estes valores de referência, ao trabalhar com amostras sanguíneas de animais hígidos de um grupo homogêneo constituído por vacas adultas no meio da lactação com ausência de leucose enzoótica bovina e livres de DVB, o que implicou em valores de leucócitos e linfócitos menores em comparação ao estudo de Schalm (1965) ($4,1$ a 12×10^3 células /mL e $3,7$ a $12,5 \times 10^3$ células /mL de valores absolutos de leucócitos, $1,6$ a $5,6$ cinco $\times 10^3$ células /mL e $1,4$ a $7,1 \times 10^3$ células /mL de valores absolutos de linfócitos) e maiores de neutrófilos ($1,8$ a $6,3 \times 10^3$ células /mL e $0,6$ a $4,4 \times 10^3$ células /mL de valores absolutos de neutrófilos). Na presente pesquisa trabalhou-se com bovinos machos com idade entre 3 a 6 meses, sem informações sobre o estatus de DVB e com manejo diferente de animais lactantes.

Diferenças em manejo, idade e raças sabidamente influenciam parâmetros fisiológicos como o hemograma, (PEIXOTO et al., 2002; GEORGE; SNIPES; LANE, 2010, BERTAGNON et al., 2011) por isso, optou-se utilizar os valores de referencia tão antigos como os estipulados por Schalm em 1965, mas que também estavam de acordo com os encontrados por Peixoto et al. 2002, que embora tenham estudaram um número pequeno de animais, eram da mesma raça, localidade e com idade semelhante aos bovinos do presente estudo.

6.2 AVALIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS E CÉLULAS BRONCOALVEOLARES: FUNÇÃO E IMUNOFENOTIPAGEM

Os ensaios de imunofenotipagem e função celular foram realizados simultaneamente, sendo avaliados os ensaios de fagocitose e metabolismo oxidativo de leucócitos sanguíneos CD14⁺ e CH138⁺ e para as células broncoalveolares CD14⁺.

Estas análises foram realizadas por citometria de fluxo e quantificadas em porcentagem de células positivas e realizando estas funções, como também em intensidade da expressão das moléculas e as funções em células individuais, mensurando a fluorescência de cada uma (intensidade média de fluorescência-IMF) (BASS et al., 1983; KOBZIK; GODLESKI; BRAIN, 1990).

No ensaio de fagocitose, foram utilizadas bactérias Gram+ e Gram- (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) marcadas com iodeto de propídio não comercialmente adquiridas. Embora esta técnica de marcação forneça resultados satisfatórios, a intensidade de fluorescência pode variar entre diferentes lotes de marcação (RAIDAL; BAILEY; LOVE, 1998), o que foi sanado, pois ambas as bactérias foram marcadas com o mesmo protocolo, ao mesmo tempo, e no mesmo lote.

No intuito de mimetizar uma infecção natural, realizou-se desafio *ex vivo* com bactérias representantes dos principais patógenos associados a quadro respiratório em bezerros (GRIFFIN et al., 2010; BENESI et al., 2012), a *Escherichia coli*, representante do grupo de bactérias Gram- e o *Staphylococcus aureus*, representante das Gram + (GRIFFIN et al., 2010).

Interessantemente, observou-se que as porcentagens e as IMF de fagocitose de *E. coli* foram sempre inferiores as de *S. aureus*, tanto para leucócitos sanguíneos como para células broncoalveolares. Possivelmente estes achados possam estar relacionados aos receptores que reconhecem padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) expressos principalmente por fagócitos.

A classe mais estudada destes receptores são os membros da família receptores tipo *Toll* (TLRs), constituído por 10 diferentes grupos, classificados de acordo com o reconhecimento de um grupo de patógenos (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010; ABBAS, LITCHMAN; PILLAI, 2012). A detecção de bactérias Gram - ocorre pelo tipo 4 (TL4), enquanto que a de Gram + ocorre pelo tipo 2 (TL2) (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010; ABBAS, LITCHMAN; PILLAI, 2012).

Ambos receptores parecem sofrer influência etária e hormonal, parecendo ser o TL4 mais expresso em animais de até dois meses de idade enquanto o TL2 para ser mais expresso

quando há secreção aumentada de cortisol (EICHER et al., 2004). Embora não tenham sido encontrados trabalhos verificando a influência etária destes receptores após o terceiro mês de vida, ou em relação a sua atividade, acredita-se que as diferenças entre a fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* possam estar relacionadas a diferenças nas expressões ou na atividade destes receptores.

Tais achados também foram verificados por Blagitz (2011) e Batista et al. (2012) e ao estudaram bovinos adultos e jovens respectivamente, fato não encontrado em outras pesquisas em razão destas não compararem os dois tipos de bactérias, optando-se por pesquisar apenas a fagocitose de *Staphylococcus aureus* (HASUI; HIRABAYASHI; YOHNSUKE, 1989; KAMPEM et al, 2004, KAMPEM; TOLLERSRUD; LUND, 2004) ou *E. coli* (HULBERT et al., 2011; BALLOU et al., 2013; COBB et al., 2014).

Este achado corrobora com a frequência dos patógenos mais implicados nos casos de complexo respiratório dos bovinos (GRIFFIN et al., 2010, BENESI et al., 2013), ressaltando-se que os microrganismos reconhecidos pelo receptor TL-4 podem ser menos eficientemente identificados pelo sistema imune que os demais, e portanto redundar numa resposta imunológica mais tardia, prolongando sua permanência no trato respiratório, o que justifica a maior incidência de afecção respiratória em bovinos por bactérias Gram -.

Ao estudar estes receptores nas células somáticas de glândula mamária de vacas desafiadas com *E. coli*, Ma et al. (2011) verificaram aumento da expressão de ambos receptores e baixa expressão de citocinas inflamatórias, sugerindo que este patógeno causa uma infecção crônica porém protetiva contra patógenos Gram + na mama.

Como Blagitz (2011) identificou também menor fagocitose de *E. coli* em comparação a *S. aureus* em desafio *ex vivo* com células da glândula mamária, acredita-se que este modelo imunitário lácteo possa ser extrapolado para o respiratório, corroborando com as evidências de que existem variações na eficiência de fagocitose de bactérias Gram + e Gram -.

O metabolismo oxidativo foi verificado pela produção indireta de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KOBZIK; GODLESKI; BRAIN, 1990; HIRABAYASHI et al., 2006) e sua prova basal indica a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na ausência de partículas intracelulares (KAMPEM et al., 2004), o que gera dúvida se esta prova reflete fidedignamente a capacidade de eliminação de patógenos intracelulares, pois não há estímulo para sua produção.

Destarte, realizou-se a prova estimulada, em que a produção de ERO é relacionada às células que fagocitaram *Staphylococcus aureus*, e portanto, mais representativa da capacidade de eliminação bacteriana, uma vez que a fagocitose é um processo dinâmico, no qual o englobamento da partícula bacteriana sinaliza a ocorrência imediata do metabolismo oxidativo (BURTON et al., 2005, BURGOS et al., 2011).

Ao comparar os dois ensaios de produção de ERO (basal e estimulado), verificou-se uma não sincronia dos resultados para as células CD14⁺, com maior produção de ERO na prova estimulada. Para as células CH138⁺ houve uma sincronia entre as provas, e estas porcentagens e IMF de ERO foram maiores no ensaio basal. Ambos os achados estão de acordo com os encontrados por Rothe e Valet, (1990) e corroboram com as afirmações de Burton et al., (2005) ao relacionarem os neutrófilos (células CH138⁺) como células mais ativas que os monócitos e portanto com maior capacidade de gerar ERO tanto espontaneamente como sob estimulação.

Quando se analisou a imunofenotipagem e funções dos leucócitos sanguíneos, observou-se que no momento 3 (120 ± 2 dias) houve aumento dos mononucleares e tendência a diminuição dos granulócitos CH138⁺ em relação ao M4 (135 ± 2 dias). Como não houve aumento de células CD14⁺, atribui-se este aumento à população de linfócitos, o que corrobora com Kampem et al, (2006) ao verificar aumento contínuo de linfócitos B até os cinco meses de idade de bezerros, cujo aumento foi mais expressivo aos três meses de vida.

Embora este fato não tenha sido verificado no hemograma, as discrepâncias de resultado entre as diferentes técnicas já era esperada devido a menor sensibilidade do hemograma em comparação a técnica de citometria de fluxo (STIELER; BERNARDO; DONOVOAN, 2012).

Na avaliação do hemograma, classificou apenas 100 leucócitos conforme suas características morfotintórias (WEISS; WARDROP, 2010). Em citometria avaliou-se 20.000 células, classificadas em citograma de acordo com tamanho e complexidade, onde é possível visibilizar uma localização bem definida da distribuição das populações de células sanguíneas, dividindo-as em e granulócitos e mononucleares (STIELER; BERNARDO; DONOVOAN, 2012). Baseado nessa localização procedeu-se ainda imunofenotipagem utilizando a molécula de superfície CH138 que é expresso em granulócitos sanguíneos de bovinos (KERESZTES et al., 1996) para o *gate* de granulócito, mostrando uma maior precisão da técnica de citometria.

Para o *gate* de mononucleares, utilizou-se apenas a marcação da molécula de superfície CD14 (Figura 2), que é expresso principalmente pelas células da linhagem de macrófagos e monócitos (TARAKTSOGLU et al., 2011; MACHUGH et al., 2012).

Monócitos são as células que fazem a principal ligação entre a resposta imune inata e tardia e são a primeira linha de defesa contra patógenos. São produzidos pela medula óssea, liberados para o sangue periférico e migram para os tecidos como macrófagos ou células dendríticas (TIZARD, 2009). Foi descoberto em humanos e mais tarde em bovinos, três subgrupos de monócitos de acordo com as moléculas de expressão CD14 e CD16, onde todas as populações expressam CD14 variando a expressão e a intensidade de expressão do CD16 (SHI; PALMER, 2011; HUSSEN et al., 2013).

De acordo com estas duas moléculas, os monócitos podem ser identificados como populações clássicas, constituída por 89% dos monócitos circulantes dos bovinos, considerados como os fagócitos profissionais, responsáveis pelas funções de fagocitose e metabolismo oxidativo, além de secretarem citocinas para modular a resposta imunológica. Os monócitos intermediários representam cerca de 4 a 5% da população de monócitos circulantes e possuem alto poder inflamatório, secretando altas concentrações de citocinas inflamatórias e alta geração de espécies reativas de oxigênio. A população restante são os monócitos não clássicos e sua função ainda não está bem definida, mas parece estar relacionada à quimiotaxia de neutrófilos, pela sua rapidez em migrar para tecidos e secretar principalmente fatores quimiotáticos (SHI; PALMER, 2011; HUSSEN et al., 2013).

No presente estudo verificou-se aumento da intensidade média de fluorescência de CD14⁺ no M3 (120 ± 2 dias de vida). Embora não tenha sido realizada a marcação da molécula CD16, sabe-se que monócitos clássicos e intermediários possuem uma intensidade média de fluorescência de CD14 maior que a de monócitos não clássicos em bovinos (HUSSEN et al., 2013). Além disso, ambos são discriminados como fagócitos produtores de ERO. Apesar de não ter sido encontrada influência etária na prova de fagocitose dessas células, observou-se tendência a aumento da porcentagem do metabolismo oxidativo estimulado de células CD14⁺ no M3 e M7 (120 e 180 ± 2 dias de vida respectivamente), sugerindo que no M3 havia um predomínio de monócitos clássicos e intermediários.

Ao examinar os granulócitos CH138⁺, verificou-se aumento da intensidade média de fluorescência do metabolismo oxidativo estimulado por células CH138⁺ no M5 (150 ± 2 dias

de vida) com posterior redução no momento seguinte ($P=0,02$) e nenhuma influência etária para as provas de fagocitose.

Tal qual o presente estudo, esta foi a única influência etária que Kampem et al. (2006) encontraram ao analisar neutrófilos de bezerros entre o terceiro ao sexto mês de vida, o que reforça os conceitos de Cortese (2009), ao ressaltar que o amadurecimento do sistema imunológico dos bovinos ocorre entre o quinto e oitavo meses de vida. Até o quinto mês de vida, os animais são capazes de responder a um patógeno, mas a resposta é mais fraca, mais lenta e menos eficaz do que a de animais com maturidade do sistema imunológico (CORTESE, 2009).

Para os ensaios das células broncoalveolares, observou-se um citograma com população dispersa tal qual encontrado por Barry et al. (2002); Soethout et al. (2004) e Batista et al. (2012), não sendo possível separar as células em *gate* de mononucleares e granulócitos baseado em tamanho e complexidade celular como realizado para leucócitos sanguíneos.

De maneira similar, procedeu-se a imunofenotipagem com a identificação das moléculas de superfície CD14 e CH138, identificando-se uma população celular positiva para a molécula CD14 e todas as células positivas para a molécula CH138 durante um piloto do estudo. Sabendo-se que a principal célula residente da região broncoalveolar são macrófagos alveolares, e concordando com os achados de Batista et al. (2012), acredita-se que a marcação de CH138 não foi capaz de identificar apenas neutrófilos broncoalveolares, sendo, portanto abolida do experimento, permanecendo apenas a marcação com a molécula CD14.

O CD14 é uma molécula de superfície expressa principalmente pelas células da linhagem monocítica-macrofágica, por isso esperava-se altas porcentagem destas células, entretanto, assim como Soethout et al. (2004) e Batista et al. (2012), identificou-se uma pequena porcentagem de células expressando esta molécula.

Hodge et al. (2004) verificaram uma fraca correlação entre as técnicas de microscopia óptica e citometria de fluxo para identificar macrófagos alveolares, sendo os valores da microscopia entre 4 a 7 vezes maiores que os da citometria ao analisar células CD14⁺. Atribuiu este efeito a autofluorescência dos macrófagos alveolares que sobrepõe ao espectro de emissão do fluorocromo, minimizando seus números.

Os pesquisadores que encontraram porcentagens de macrófagos alveolares identificados pela molécula CD14 mais alta, utilizam células provenientes de cultura (TARAKSOGLU et al., 2011; MACHUGH et al., 2012) o que diminui sua

autofluorescência (STRECK et al., 1994), resultando em valores mais expressivos. No entanto, em estudo piloto, verificou-se que as porcentagens de células autofluorescentes (observada por tamanho- FSC *forward scatter cell* e intensidade de fluorescência) eram levemente superior à marcação com CD14, mantendo proporcionalidade entre as duas variáveis. Como a marcação com anticorpos aumenta a especificidade do teste (TIZARD, 2009) preconizou-se o uso de CD14⁺ como marcador padrão de macrófagos alveolares.

Outra hipótese para a baixa expressão de CD14⁺ poderia ser relacionado a outras células que não macrófagos (epiteliais e linfócitos grandes) ou outras subpopulações de macrófagos, que realizam diferentes funções além da fagocitose e não expressam o CD14 como sugerido por Raidal, Bailey e Love (1998) e Batista et al. (2013).

Quando analisada a influência etária na expressão da molécula CD14, verificou-se um aumento de células CD14⁺ no M3 (120 ± 2 dias de vida) em comparação aos momentos M1 e M5 (90 e 150 ± 2 dias de vida respectivamente, P=0,04). De maneira similar, foi observado um aumento de mononucleares no sangue no M3, com aumento de IMF para expressão desta molécula, poderia indicar uma imaturidade das células apresentadoras de antígeno, que precisam de um maior número para exercer a mesma função que uma célula mais madura (REBER et al., 2008).

Quando avaliada a produção de ERO e fagocitose de *E. coli* verificou-se uma maior atividade desta célula, observado por aumento da porcentagem de células CD14⁺ broncoalveolares realizando metabolismo oxidativo basal nos M2, M3 e M4 (105, 120 e 135 ± 2 dias de vida respectivamente) com aumento da IMF no M3 e aumento da porcentagem de células CD14⁺ fagocitando *E coli* também no M3.

Tal incremento na atividade foi apenas local, tendo em vista que estes comportamentos não foram evidenciados pelas células CD14⁺ sanguíneas.

Similarmente Cobb et al. (2014) verificaram que a instalação de dois ou três bezerros por baia aumentou a incidência de doença respiratória em comparação a bezerros mantidos isolados, embora não tenha influenciado nas função de fagocitose e metabolismo oxidativo de neutrófilos sanguíneos. Apesar do fato não ter sido discutido pelos autores, nota-se que as respostas sistêmica e local possuem comportamento distinto e possivelmente com maturação independente.

Em relação ao metabolismo oxidativo estimulado e fagocitose de *Staphylococcus aureus*, verificou-se aumento destas atividades nos M5 e M5 e M6 respectivamente, cujos

comportamentos igualmente não acompanharam os encontrados pelas células CD14⁺ sanguíneas.

Diante dos fatos, acredita-se que no M1 e M2 as células ainda estão imaturas com capacidade reduzida de fagocitose e produção exagerada de ERO na ausência de estímulos. No M3, existe um aumento de células CD14⁺, que ainda produzem exageradamente ERO sem estímulo, mas que já começam a aumentar sua capacidade de fagocitose apesar de não aumentarem a produção de ERO quando estimuladas, confirmando a hipótese de que, por serem ainda imaturas, necessitam de maior número para manter o trato respiratório hígido (ACKERMAN, DERSCHEID; ROTH, 2010).

No M5 (150 ± 2 dias de vida) as células CD14⁺ apresentam-se na sua máxima eficiência, pois em menor número ainda são capazes de fagocitar *Staphylococcus aureus* e produzir ERO suficiente quando estimuladas e em quantidades superiores ao M7 (180 ± 2 dias de vida). Fato que permite apresentar duas hipóteses.

Na primeira, as células broncoalveolares atingem sua maturidade no M5, quando os bezerros atingem uma idade média de 150 dias, e por algum motivo, quando atingem 180 dias, reduzem sua atividade celular. Durante a criação de bezerros, são comuns fatores estressantes do manejo promoverem redução da imunidade (ISHIZAKI; HANAFUSA; KARIYA, 2005; BERTAGNON et al., 2011). No entanto os animais foram submetidos às mesmas condições de manejo durante todo o período experimental, não sendo possível identificar o fator causal para o comprometimento imune.

Na segunda hipótese, poderíamos sugerir que no M5 exista uma resposta inflamatória mais reativa para manter o trato respiratório hígido, caracterizada pela produção excessiva de ERO sobre estimulação. Tal fato já foi relatado pela literatura, que ressalta que bovinos entre 3 a 5 meses, a resposta pode se tornar exacerbada, causando danos teciduais mais intensos devido à maciça infiltração neutrofílica no local inflamado após inoculação com patógenos (GRELL et al., 2005 a,b; PLATT et al., 2009).

6.3 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS E BRONCOALVEOLARES

No presente trabalho não se encontrou influência etária para os teores ou porcentagem das imunoglobulinas séricas. Poucos são os trabalhos que verificam a resposta humoral no período estudado, normalmente limitando os estudos durante o primeiro trimestre de vida dos bezerros (FEITOSA et al., 2003; COSTA et al., 2008; BATISTA, 2011).

Sabe-se que bezerros neonatos montam um padrão de resposta predominantemente Th2, suprimindo respostas de memória e mediada por células e favorecendo a produção de anticorpos, especialmente a produção de IgM (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Iniciam uma resposta ativa entre 60 a 90 dias (PRADO et al., 2006; COSTA et al., 2007; VETTORATO et al., 2012), nos quais os teores de anticorpos só atingem os teores de um animal adulto, com aproximadamente quatro a seis meses de idade, sendo a IgG1 a classe de imunoglobulina predominante, seguida pela IgG2, que é secretada em quantidades duas vezes menores que um animal adulto (PRADO et al., 2006; CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

No presente estudo encontrou-se também um predomínio de IgG1, sendo estes teores um pouco mais elevados que os descritos por Batista (2011) em bezerros entre um a três meses de idade (que variavam entre 1102 e 4835 mg/dL) e, bastante superiores aos encontrados em animais adultos (859- 2657 mg/dL) por Barbosa Lima (2013). Os teores de IgG2 foram semelhantes aos encontrados por Batista et al (2011) para bezerros mais novos (136-689 mg/dL) e inferiores aos encontrados por animais adultos (1663- 3746,2mg/dL) por Babosa Lima (2013), cerca de quatro a cinco vezes menores. Os teores de IgM também foram semelhantes aos encontrados por Batista (2011), porém a metade do encontrado por Barbosa Lima (2013) em animais adultos. E os teores de IgA foram bem mais inferiores aos encontrados em animais mais novos e em animais adultos (BATISTA, 2011; BARBOSA LIMA, 2013).

Ambos os pesquisadores trabalharam com mesma técnica de ELISA que a presente pesquisa, utilizando bovinos holandeses com manejo semelhante ao adotado na presente pesquisa, especialmente quando analisados os bezerros de um a três meses de idade. Ambos os trabalhos obtiveram dados com alto desvio padrão, semelhante aos obtidos neste experimento, mesmo assim pode-se observar que as imunoglobulinas apresentam um comportamento diferente do encontrado por animais mais jovens e dos adultos, encontrando-se uma produção ativa mais expressiva de IgG1, e com adaptações para as respostas de IgM, IgA e IgG2 durante esta interface etária.

Em outro experimento, Grell et al. (2005a) encontraram resultados semelhantes ao estudar a resposta humoral de bezerros desfiados com BRSV nas idades de um, cinco e oito meses de vida, com exceção para a resposta de IgA, cujos títulos foram em mais altos em animais mais velhos que nas idades intermediárias e jovens, atribuindo estas diferenças as quantidades de células B, que eram quatro a cinco vezes menores no grupo mais jovem e uma e meia a duas vezes menores no grupo intermediário em comparação ao grupo mais velho.

Tais achados permitem supor que ainda nesta fase de três a seis meses de idade, os bezerros ainda não apresentam uma maturação da resposta humoral, contrariando os relatos de Chase et al. (2008) e Prado et al. (2006), mas concordando com Kimman et al. (1987), ao citarem que os anticorpos maternos IgG1, presentes ainda nesta fase, suprimem todos os outros isotipos com exceção dele mesmo. Com a maturidade, haverá uma secreção menos expressiva da classe IgG1 de imunoglobulinas séricas e aumento e maturação das células B e de memória, (GRELL et al., 2005a; KAMPEM et al., 2006) culminando em aumento da secreção dos outros isótopos de imunoglobulinas.

Esperava-se um aumento nos teores de imunoglobulinas conforme a faixa etária tal qual foi encontrado nos trabalhos de Prado et al. (2006) e Vettorato et al. (2012) que verificaram aumento dos títulos de IgG2 a partir dos 140 dias e de IgG1 a partir dos 150 dias de vida (Prado et al, 2006). Como os bezerros do presente experimento não tiveram alterações no manejo durante a faixa etária estudada, acredita-se que continuaram expostos aos mesmos antígenos desde o início do experimento, e por isso não promoveram estimulação ativa de imunoglobulinas como os bezerros dos experimentos supracitados.

Diferente do soro sanguíneo, a técnica de coleta de lavado broncoalveolar pode interferir nos valores absolutos das imunoglobulinas, pois na dependência do método empregado, a recuperação do material instalado no trato respiratório é bastante variável de animal para animal, gerando diferentes diluições das amostras, tornando imprecisa a comparação dos valores absolutos das variáveis analisadas (BERTAGNON et al., 2007).

Para a mensuração do teor absoluto das variáveis obtidas por lavagem do trato respiratório geralmente se faz necessária a correção dos valores por meio da quantificação da ureia sérica. Por esta ter um baixo peso molecular é considerada substância de distribuição homogênea por todos os fluidos corpóreos e é usada como fator de correção de diluição do lavado por diferentes pesquisadores (RENNARD et al., 1986; FERNANDES, 2001; BERTAGNON et al., 2007).

Na presente pesquisa a taxa de recuperação do LBA através da broncoscopia foi entre 83 a 75%. Hennig-Pauka et al. (2007), ao comparar as três técnicas para a realização do lavado broncoalveolar em suínos, verificaram que as amostras adquiridas por broncoscopia apresentavam maiores concentrações de líquido recuperado e consequentemente maiores teores de ureia, e quantidade total de células em comparação às técnicas endotraqueal e transtraqueal, não havendo necessidade da utilizar o fator de correção da ureia para a técnica de LBA, já que a taxa de recuperação da amostra instalada no trato respiratório foi alta (HENNIG-PAUKA et al., 2007).

Bertagnon et al. (2007) empregaram o fator de correção da diluição das amostras obtidas por sondagem nasotraqueal e obtiveram valores semelhantes ao encontrado na pesquisa de Batista (2011), que não utilizou tal correção ao empregar a mesma técnica de broncoscopia que a presente pesquisa, corroborando com a pesquisa feita por Hennig-Pauka et al. (2007) mostrando que quando há altas taxas de recuperação da amostra a correção não se fez necessária.

Mesmo assim, optou-se por expressar os resultados das imunoglobulinas por valores absolutos e por porcentagens das diferentes classes de imunoglobulinas, observando-se que o padrão de comportamento foi muito semelhante, o que permite inferir que quando a recuperação de LBA é superior a 65%, não há necessidade de empregar fator de correção de diluição das amostras.

Em bezerros neonatos, o teor de IgG no lavado broncoalveolar é maior que o de IgA, e a secreção de IgG1 maior que a de IgG2 (PRINGLE et al., 1988, KALINA; WOOLUMS; GERSHWIN, 2005; BERTAGNON et al., 2007). Com o passar do tempo existe uma redução dos teores de IgG, sendo substituído pelo aumento de IgA, sendo esta a classe de imunoglobulina predominante desde o segundo mês de vida dos bezerros (BATISTA, 2011).

De maneira similar Kalina, Woolums e Gershwin (2005) verificaram que bezerros desafiados com VSRB aos quatro meses e meio de idade montam uma resposta mais robusta com IgA e produção de IL-5 indicando um predomínio de resposta Th2 nesta fase, diferente dos animais com idade de três meses e meio, que apresentaram tanto aumento de IgG1 e de IgA.

A IgA sempre foi a imunoglobulina predominante da região broncoalveolar, e não sofreu influencia etária, estando em porcentagens muito maiores que as encontradas por Batista (2011) em bezerros com até três meses de idade. As porcentagens de IgG1e IgM

sempre foram menores e os teores de IgG2 foram similares aos achados de Batista (2011), em relação aos bezerros mais novos, indicando que existe uma adaptação da secreção destas imunoglobulinas conforme a faixa etária.

Contudo ao analisar os teores de IgG1 e IgG2, identificou-se um equilíbrio entre os teores de IgG1 e IgG2 até os momentos anteriores ao M6 (165 dias de vida), momento em que aumentou muito os teores de IgG1, sugerindo uma resposta Th2 neste período, tal qual sugerido por Kalina, Woolums, Gershwin (2005).

6.4 EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS E CÉLULAS BRONCOALVEOLARES

O paradigma do perfil Th1 / Th2 tem sido bastante estudado em bovinos com intuito de avaliar a eficiência de vacinas (MENA et al., 2002; ANTONIS et al., 2010; LEACH et al., 2012) ou a patogenia de infecções parasitárias (INGALE et al., 2008; ALMERIA et al., 2012; HOLMGREN et al., 2014), mas não em condições basais. Identificou-se que citocinas relacionadas ao padrão Th1 – INF γ , IL-2, IL12, TNF- α , induzem um efeito predominantemente citotóxico, ativando células NK (*natural killer*), aumentam a quimiotaxia neutrofílica, estimulam a produção de IgG2 por linfócitos B e ao mesmo tempo regulam os linfócitos Th2, inibindo a produção de IL-4 e IL-10 (KIDD, 2003; TIZZARD, 2009; ABBA; LITCHMAN; PILLAI, 2012).

As citocinas padrão Th2-, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 induzem a produção principalmente de IgE por linfócitos, com proliferação e quimiotaxia eosinofílica caracterizando uma resposta predominantemente alérgica e bem característica em humanos e camundongos. Em bovinos não é tão caracterizada como alérgica e parece estar ligada também a estimulação de secreção de IgG1, inibição das funções dos macrófagos e da secreção de IL-12 e INF- γ , inibindo assim a resposta Th1 (MENA et al., 2002; KIDD, 2003; HOEK et al., 2008; TIZZARD, 2009).

A citocina padrão Th2 mais estudada é a IL-4, a qual não foi detectada neste trabalho, similarmente aos achados Ingale et al. (2008) e Holmgren et al. (2014), ao pesquisarem esta

citocina em leucócitos sanguíneos e broncoalveolares em situação basal de bovinos. Como os principais produtores de IL-4 são eosinófilos (VOERINGER; SHINKAI; LOCKSLEY, 2004), que estão presentes em pequenas quantidades nos fluidos analisados de bezerros saudáveis (SHALM, 1965; LIGGITT, 1985; PEIXOTO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2004; GEORGE; SNIPES; LANE, 2010; GRIFFEN et al., 2010; BENESI et al., 2012), acredita-se que, em condições basais, a expressão e a secreção desta citocina seja mínima e, portanto indetectável pela técnica empregada.

Apesar de existir variados ensaios para detecção de citocinas em humanos e camundongos, o mesmo não ocorre para bovinos (MENA et al., 2002; HOLMGREN et al., 2014). Frente às limitadas técnicas, preconizou-se utilizar o método mais sensível optando-se pela PCR em tempo real (DENG; LI; TANG, 2003) frequentemente utilizado em pesquisas com citocinas de bovinos (MENA et al., 2002; INGALE et al., 2008; ANTONIS et al., 2010; LEACH et al., 2012; ALMERIA et al., 2012; HOLMGREN et al., 2014). Pesquisadores que detectaram expressão gênica de IL-4 de leucócitos de bovinos saudáveis utilizaram cultura de PBMC estimulado com ConA ou PHA (MENA et al., 2002; OHTSUKA et al., 2014), situação que não mimetiza um estudo *in vivo*. Portanto diante das dificuldades encontradas, preferiu-se não alterar a técnica, não se detectando esta citocina em nenhum momento.

Para as demais mensurações de citocinas, detectou-se resultados assimétricos e de distribuição não normal, tal qual os achados de Almeria et al. (2012), Holmgren et al. (2014) e Kabara et al. (2014).

Embora nenhum destes trabalhos tenha avaliado a função etária na produção dessas citocinas, observa-se que entre o primeiro e o quinto mês de vida há um predomínio de resposta Th1 pelos leucócitos sanguíneos (MENA et al., 2002; GRELL et al., 2005b; LEACH et al., 2012; OHTSUKA et al., 2014), ou um equilíbrio entre os dois perfis até três a quatro meses, com predomínio Th1 posteriormente até os cinco meses (PLATT et al., 2009). Os resultados da presente pesquisa concordaram com a maioria dos autores ao encontrar um predomínio de resposta Th1, observada por maior expressão de IL-12 e baixa expressão de IL-10 até a faixa etária de 150 dias (M5), fato que se inverteu no momento seguinte, apesar de não ter sido identificada alteração na expressão de TNF- α .

Corroborando com estes achados, Grell et al. (2005a) também não detectaram citocinas em bezerros com um mês de idade no momento basal. Para os animais de cinco meses encontraram apenas TNF- α e para os animais de oito meses, TNF- α , IL-10 e IL-6, ao

pesquisarem a secreção das citocinas TNF- α , INF- γ , IL-10 e IL-6 em cultura de células mononucleares sanguíneas, mostrando que existe uma influência etária na sua produção.

Após o desafio destes bezerros com VSRB, estas mesmas células foram capazes de secretar citocinas inflamatórias em quantidade mais expressiva no grupo mais jovem (TNF- α , INF- γ e IL-6), moderada no grupo intermediário e baixa no grupo mais velho, secretando em todas as idades teores similares de IL10, apresentando um padrão de resposta celular, com manifestações clínicas mais expressivas nos animais mais novos, sugerindo uma resposta inflamatória exagerada apesar da presença da citocina regulatória (IL10). Com o passar da idade, acredita-se que a citocina regulatória controlou melhor a inflamação, direcionando para um padrão de resposta humoral aos oito meses de idade (GRELL et al., 2005a). Infelizmente o trabalho explora pouco esta fase intermediária, chave para o melhor entendimento da maturação da resposta imune.

Discordando de Grell et al. (2005a), OTHSUDA et al. (2014) encontraram influência etária na secreção de IL-10 sérica, verificando que a expressão desta citocina tende a aumentar com a idade em bezerros holandês e da raça Japonesa black dos primeiros dias até o primeiro mês de vida.

Em outro trabalho, Grell et al. (2005b) também verificaram predomínio de resposta Th1 em bezerros desafiados por VSRB aos 90-147 dias de vida, verificado por aumento de INF- γ , resposta típica celular, com predomínio de células NK e inflamação pulmonar grave verificada por aumento de haptoglobina, IL-6 e manifestações clínicas bastante evidentes. Quando estes animais foram reinoculados três meses depois, observou-se uma pequena resposta inflamatória, com discretos aumentos das mesmas variáveis, atribuindo este quadro mais brando a diferenças etárias ou insucesso na reinoculação.

Se de fato estes achados foram devido à influência etária, estão de acordo com o presente trabalho que verificou alteração do perfil de citocinas secretadas entre o M5 ao M7 (150 e 180 $\pm$ 2 dias de vida).

Em relação às células broncoalveolares, evidências sugeriram alterações na magnitude da resposta inflamatória conforme a faixa etária, provavelmente relacionados ao padrão de resposta Th1 em bezerros mais velhos (dois meses) e de resposta Th2 em animais menores de 30 dias de vida (GRELL et al., 2005 a,b; ANTONIS et al., 2010).

De acordo com a literatura, encontrou-se TNF- α e IL-12 elevados no momento 5 (150 $\pm$ 2 dias de vida). Estas são citocinas pró-inflamatórias produzidas principalmente por

macrófagos ativados, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos ao local da lesão, bem como pelo aumento do metabolismo oxidativo. Para sua interpretação clínica deve ser considerado que é bastante tênue o limite que separa uma resposta inflamatória benéfica de uma exagerada e, portanto deletéria (DECLEVA et al., 2002).

O comportamento da expressão gênica das citocinas IL-10 e IL-12 pelos leucócitos sanguíneos e células broncoalveolares foi similar, notando-se aumento gradual da IL-12, significativo no momento cinco (150 ± 2 dias de vida) e redução no momento posterior, com correlação positiva entre os dois locais de produção ($r = 0,89$, $P = 0,01$). No M6 (165 ± 2 dias de vida), também se verificou tendência a aumentar a IL-10, nos dois locais, embora com correlação moderada e não significativa ($r = 0,55$, $P = 0,17$). Já a expressão gênica de TNF- α se manteve constante nos leucócitos sanguíneos e aumentou nas células broncoalveolares no M5.

Para a imunidade sistêmica encontrou-se relação entre a resposta citotóxica e padrão Th1 (CHAOUAT et al., 2002; KIDD, 2003; TIZARD, 2009), verificando-se no M5 (150 ± 2 dias de vida) aumento do metabolismo oxidativo estimulado (IMF) de células CH138⁺ e de células CD14⁺ (%) sanguíneas e aumento de IL-12. No momento seguinte, M6 (165 ± 2 dias de vida) observou-se redução desta resposta quando houve aumento de IL-10, porém não se encontrou relação com as secreções dos isotipos IgG1 e IgG2 conforme a faixa etária, havendo predomínio do isótopo IgG1 em todos os momentos. Os achados também não puderam ser relacionados à fagocitose.

Como as características e a magnitude da resposta imune são orquestradas pelo microambiente formado pelas citocinas secretadas (KIDD, 2003; TIZARD, 2009), acredita-se que no sangue não existiu um padrão típico de resposta, e sim um equilíbrio entre as duas, possivelmente polarizado por outras citocinas não mensuradas neste estudo. Almeria et al. (2012), evidenciaram aumento de citocinas Th1 e ao mesmo tempo de IL-10 demonstrando que nem sempre há um padrão único de resposta imune.

Quando as dinâmicas da região broncoalveolar foram analisadas, observou-se que até o momento 5, os animais apresentavam um perfil secretório equilibrado entre IgG1 e IgG2, redução de macrófagos expressando CD14⁺ e aumento do metabolismo oxidativo, demonstrando um padrão de resposta predominante Th1.

Considerando-se que bezerros entre três a cinco meses quando desafiados com patógenos intratraquealmente montam uma resposta inflamatória maior e com dano tecidual mais intenso em comparação a animais mais novos, (GRELL et al., 2005a), acredita-se que no

momento 5 (aos 150 dias de vida) exista resposta inflamatória exagerada para manter o trato respiratório hígido.

Embasando melhor esta hipótese, notou-se que no momento seguinte, 165 ± 2 dias de vida, houve uma tendência a aumentar a IL10, citocina regulatória incriminada em suprimir a resposta inflamatória local (CHAOUAT et al., 2002). Tal comportamento coincidiu com o aumento da secreção de IgG1 e redução da produção de ERO, sendo este perfil compatível com resposta regulatória ou Th2 (KIDD, 2003; TIZARD, 2009). Esse comportamento foi semelhante ao encontrado por Souza et al. (2008), ao verificarem um aumento da secreção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-12) seguida por uma resposta elevada de IL-10 na tentativa de evitar que a resposta imune seja deletéria ao hospedeiro.

Em humanos e camundongos, o paradigma Th1 e Th2 também se aplica aos macrófagos, que podem ser classificados com e M1, macrófagos classicamente ativados e M2, macrófagos alternativamente ativados. M1 predominam na fase inicial da inflamação, possuem alta capacidade microbicida secretando citocinas inflamatórias particularmente TNF- α e IL-12 e altas concentrações de ERO, e os M2 prevalecem nas fases de reparação tecidual, secretando componentes da matriz extracelular e citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e IL-13 (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófago expressam os mesmo receptores que identificam o padrão M1 e M2, prevalecendo a expressão dos receptores M2 em estado basal, estando os receptores do M1 quiescentes. Em estados inflamatórios, os altos níveis de hepcidina regulam a absorção de ferro, estocando-o em macrófagos teciduais e em hepatócitos e diminuindo a absorção de ferro por enterócitos, para limitar a proliferação de células de alta replicação como os microrganismos e células tumorais (NEMETH; GANZ, 2006).

Assim, mediadores inflamatórios como deposição de ferro em macrófagos e secreção de TNF- α , induzem a mobilização do fenótipo M1, que por sua vez aumentam a capacidade do metabolismo oxidativo, independente do aumento da atividade de fagocitose (SINDRILARU et al., 2011), indicando que o mecanismo inflamatório ocorreu no M5.

Conforme ocorre a diminuição da hepcidina e por consequência a diminuição da deposição de ferro intracelular ou há a secreção de IL-10, prevalece o fenótipo M2 evitando um prolongamento ou uma inflamação exagerada (Sindrilaru et al, 2011), limitando o metabolismo oxidativo, que em quantidades exageradas promoveria lesão tecidual, tal qual observado no M6.

Posteriormente, no M7 (180 ± 2 dias de vida) houve redução da IL-10 e leve aumento de IL-12, TNF- α , metabolismo oxidativo e novamente, um equilíbrio entre IgG1 e IgG2, sugerindo que estas oscilações ocorridas nos momentos 5 e 6 foram referentes a um ajuste fino para que a resposta imune se tornasse eficiente aos 180 (± 2 dias de vida) dias.

Diante dos achados é possível identificar que a defesa imune broncoalveolar sofre continua maturação até o sexto mês de vida dos bezerros. A partir do M4 (135 ± 2 dias de vida), as atividades de fagocitose e metabolismo oxidativo são mais eficientes em relação às idades mais precoces, o que indica à possibilidade dos animais serem menos susceptíveis a broncopneumonia.

Apesar desta aparente menor susceptibilidade a broncopneumonias, especula-se que quando os animais se tornam doentes, entre o M4 e particularmente no M5, (135 a 150 ± 2 dias de vida) apresentariam uma resposta celular exagerada diante da capacidade aumentada de produzir ERO em desafio *ex vivo*. Soma-se a isto, um predomínio de resposta celular frente a humoral, o que torna a capacidade de dano tecidual durante uma infecção, mais factível. Diante desta resposta exagerada, os mecanismos regulatórios começam a ser tornar mais eficientes nos M6 e M7 ($165 - 180 \pm 2$ dias de vida), o que conduz a um ajuste da resposta celular devido a um provável equilíbrio entre as respostas celular e humoral.

Mais estudos tornam-se necessários para elucidar a resposta humoral, relacionados à maturação de linfócitos, particularmente os linfócitos B, verificando se de fato ocorre maior eficiência desta resposta entre os M6 e M7.

Acredita-se que este é a primeira pesquisa que identifica particularidades da resposta imunológica broncoalveolar durante o período de estabelecimento de imunidade própria de bezerros independente de fatores maternos, em condições basais. Tais achados trazem contribuições que auxiliarão no planejamento de terapias e medidas profiláticas de broncopneumonia, na tentativa de reduzir os índices de letalidade deste período.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que a resposta imune tem característica própria nesta fase de estabelecimento da imunidade ativa do bezerro independente dos fatores maternos e não se torna matura até os seis meses de vida. Apesar dos fagócitos pulmonares serem eficientes a partir dos 135 dias de vida, parecem ser hiperresponsivos aos 150 dias de vida, fase em que há predominância de perfil Th1. Posteriormente, acredita-se que as citocinas promovam um ajuste fino, o que resulta, em um primeiro momento, em resposta preponderantemente regulatória e/ou Th2 para, em seguida, atingir um equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2, aos 180 dias de vida, razão de uma resposta mais eficiente à eliminação de patógenos sem causar danos ao hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 8. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. 566 p.

ACKERMAN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. Innate immunology of Bovine Respiratory Diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 215-228, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland, 2002. 1616 p.

ANDERSON, D. B.; MOORE, P. F.; HYDE, D. M.; DUNGWORTH, D. L. Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle: relationship to age. **Research in Veterinary Science**, v. 41, n .1, p. 211-220, 1986.

ALMERIA, S.; SERRANO, B., YANIZ, J. L.; DARWICH, L.; LOPEZ-GATIUS, F. Cytokine gene expression. Profiles in peripheral blood mononuclear cells from neospora caninum naturally infected dams throughout gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 237-243, 2012.

ANTONIS, A. F. G.; JONG, M. C.; VAN DER POEL, W. H. M.; VAN DER MOST, R. G.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; KIMMAN, T.; SCHRIJVER, R. S. Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 2497–2506, 2010.

AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos**. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BARRY, S. M.; CONDEZ, A.; JOHNSON, M. A.; JONOSSY, G. Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease. **Cytometry (Clinical Cytometry)**, v. 50, p. 291-297, 2002.

BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.

BALLOU, M. A.; SUTHERLAND, M. A.; BROOKS, T. A.; HULBERT, L. E.; DAVIS, B. L.; COBB, C. J. Administration of anesthetic and analgesic prevents the suppression of many leukocyte responses following surgical castration and physical dehorning. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 15, p. 285-293, 2013.

- BARBOSA LIMA, M. G. Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia. 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014
- BATISTA, C. F. **Dinâmica da resposta imune inata do sistema respiratório de bezerros.** 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011
- BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M. G.; SANTOS, B. P.; BERTAGNON, H. G.; PARRA, A. C.; VIANNA, R. S.; LUCCA, G. G.; LIMA, D. M.; SANTOS, D. S.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Maturation of mononuclear phagocytes in the lungs of young calves—In vitro study. **Journal Dairy Science.**, v. 95, p. 5909–5915, 2012.
- BENESI, F.J. Diarréia infecciosa neonatal dos bezerros. In: I SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1996. São Paulo.1996. p. 15-24.
- BENESI, F. J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros. Importância e avaliação crítica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 16, n. 1, p. 38-48, 1993.
- BENESI, B.; WACHHOLZ, L.; BERTAGNON, H. G.; LEAL, M. L. R.; MORI, E.; FERNANDES, W. R. Citologia dos lavados traqueobrônquico (LTB) e broncoalveolar (LBA) de bezerros holandeses sadios durante o primeiro mês de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v. 32, n. 3, p. 267-270, 2012.
- BENESI, F. J.; BERTAGNON, H. G.; WACHHOLZ, L.; LEAL, M. R. L.; FERNANDES, W. R.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Microbiota bacteriana e citologia da região traqueobrônquica de bezerros no período neonatal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p.700-704, 2013
- BENESI, B.; WACHHOLZ, L.; BERTAGNON, H. G.; LEAL, M. L. R.; MORI, E.; FERNANDES, W.R.Citologia dos lavados traqueobrônquico (LTB) e broncoalveolar (LBA) de bezerros holandeses sadios durante o primeiro mês de vida. **Pesq. Vet.**
- BELLINAZZI, J. B.; BERTAGNON, H. G.; BATISTA, C. F.; DOS SANTOS, B. P.; BARBOSA LIMA, M. G.; LIMA, D. M.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. P. M. Efeitos do estresse da orquiectomia na citologia broncoalveolar de bezerros da raça Holandesa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 93-98, 2013.
- BERTAGNON H. G.; ESPER G. V. Z.; EMANUELLI M. P.; PELLEGRINE L.G. Influência meteorológica no leucograma e na população citológica do trato respiratório de bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 244-246, 2011.
- BERTAGNON, H. G.; SILVA, P. E. G.; WACHHOLZ, L.; LEAL, M. L. R.; FERNANDES, W. R.; BENESI, F. J. Imunoglobulinas no trato respiratório de bezerros sadios durante o primeiro mês de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 487-490, 2007.
- BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica Veterinária.** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p.v2-49.

- BLAGITZ, M. G. **Avaliação funcional de fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina**. 2011.161 p.Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BURGOS, R. A.; CONEJEROS, I.; HIDALGO, M. A.; WERLING, D.; HERMOSILLA, D. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, p. 1– 10, 2011.
- BURTON, J. L.; MADSEN, S. A.; CHANG, L.; WEBER, P. S. D.; BUCKHAM, K. R.; VAN DORP, R.; HICKEY, M. C.; EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, p. 197–219, 2005.
- 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.
- CHATTHA, K. S.; FIRTH, M. A.; HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. Variation in expression of membrane IgM, CD21 (CR2) and CD32 (Fcγ RIIB) on bovine lymphocytes with age: A longitudinal study. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 510–517, 2010.
- CHAOUAT, G.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S.; LAPPRE DELAGE, G.; DUBANCHET, S.; LEDDE, N.; MARTAL, J. A brief review of recent data on some cytokine expression at materno-foetal interface wich might challenge the classical Th1, Th2 dichotomy. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 53, p. 241-256, 2002.
- COBB, C. J.; OBEIDAT, B. S.; SELLERS, M. D.; PEPPER-YOWELL, A. R.; BALLOU, M. A. Group housing of Holstein calves in a poor indoor environment increases respiratory disease but does not influence performance or leukocyte responses. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 3099 – 3109, 2014.
- COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C.; KOHAYAGAWA, A.; SOUZA, T. S. Proteinograma sérico de bezerras da raça Holandesa do nascimento aos 150 dias de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n.4, p. 267-275, 2007.
- COSTA, M. C.; FLAIBAN, K. K. M. C.; CONEGLIAN, M. M.; DOGNANI, R.; VETTORATO, E. D.; BALARIN, M. R. S.; LISBÔA, J. A. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros das raças Nelore e Limousin nos primeiros quatro meses de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 431-436, 2008.
- DENG, X.; LI, H.; TANG, Y.W. Cytokine expression in respiratory syncytial virus infected mice as measure by quantitative reverse transcripase PCR. **Journal Virology. Methods**, v. 107, p. 141-146, 2002
- DECLEVA, E., DRI, P.; MENEGAZZI, R.; BUSETTO, S.; CRAMER, R. Evidence that TNF-induced respiratory burst of adherent PMN is mediated by integrin. **Journal Leukocyte Biology**, v. 72, p. 718-726, 2002.

DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STOBBER, M. **Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.

EICHER, S. D.; MCMUNNA, K. A.; HAMMONB, H. M.; DONKIN, S. S. Toll-like receptors 2 and 4, and acute phase cytokine gene expression in dexamethasone and growth hormone treated dairy calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, p. 115–125, 2004.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H.; MIRANDOLA, R. M. S.; PERRI, S. H. V. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteínas total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 251-255, 2001.

FERNANDES, R. W. **Estudo clínico e da dinâmica de imunoglobulinas séricas e no lavado Broncolaveolar de eqüinos experimentalmente infectados com herpesvírus eqüino tipo 1**. 2001. 92 f. Tese (Livre Docência)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GEORGE J. W.; SNIPES, J.; LANE, V. M. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. **Veterinary Clinics Pathology**. v. 39, n. 2, p. 138-148, 2010.

GONÇALVES, R. C.; FEITOSA, F. L. F. Semiologia do sistema respiratório de grandes animais. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnostico**. São Paulo: Roca, 2014. p.275-306.

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

GONÇALVES, R. C.; MATTOS, M. C. F. I.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; LOPES, R. S.; BORGES, A. S. Lavagem traqueobrônquica por sondagem nasotraqueal em bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 307-311, 2004.

GORDEN, P. J.; PLUMMER, P. Control, Management, and Prevention of Bovine Respiratory Disease in Dairy Calves and Cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 243–259, 2010.

GRELL, S. N.; KIRSTEN TJORNEHOJ, U. R.; LARSEN, L. E.; HEEGAARD, M. H. Age-dependent differences in cytokine and antibody responses after experimental RSV infection in a bovine model. **Vaccine**, v. 2, p. 3412–3423, 2005a.

GRELL, S. N.; KIRSTEN TJORNEHOJ, U. R.; LARSEN, L. E.; HEEGAARD, M. H. Marked induction of IL-6, haptoglobin and IFN γ following experimental BRSV infection in young calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 10, p. 235–245, 2005b.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA M. M.; KUSZAK J.; SCOTT MCVEY, D. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 26, p. 381-394, 2010.

- HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; YOHNOSUKE, K. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.
- HENNIG-PAUKA, I.; BREMERICH, S.; NIENHOFF, H.; SCHRODER, C.; GANTER, M.; BLECHA, F.; WALDMANN, K. H.; GERLACH, G. F. Comparison of Three Common Methods of Lung Lavage in Healthy Pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, p. 428–433, 2007.
- HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 1-2, p. 12-23, 2006.
- HODGE, S. J.; HODGE, G. L.; HOLMES, M.; REYNOLDS, P. N. Flow cytometric characterization of cell populations in bronchoalveolar lavage and bronchial brushings from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 61, n. 1, p. 27-34, 2004.
- HOEK, A.; RUTTEN, V. P. M. G.; KOOL, J.; ARKESTEIJN, G. J. A.; BOUWSTRA, R. J.; VAN RHIJN, I.; KOETS, A. P. Subpopulations of bovine WC1+ T cells rather than CD4+CD25^{high}Foxp3+ T cells act as immune regulatory cells ex vivo. **Veterinary Research**, v. 40, n. 1, p. 1-14, 2009.
- HOLMGREN, S.; HAGBERG GUSTAVSSON, M.; KUNDEN, A.; WATTRANG, E. Cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells during *Dictyocaulus viviparus* infection in calves. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 78-86, 2014.
- HULBERT, L. E.; CARROLL, J. A.; BURDICK, N. C.; RANDEL, R. D.; BROWN, M. S.; BALLOU, M. A. Innate immune responses of temperamental and calm cattle after transportation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, p. 66–74, 2011.
- HUSSEN, J.; DUVEL, A.; SANDRA, O.; SMITH, D.; SHELDON, I. M.; ZIEGER, P.; SCHUBERTH, H. J. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. **PLoS ONE**, v. 8, p. 8, e71502, 2013.
- INGALE, S. L.; SINGH, P.; RAINA, O. K.; MEHRA, U. R.; VERMA, A. K.; GUPTA, S. C.; MULIK, S. V. Interferon-gamma and interleukin-4 expression during *Fasciola gigantica* primary infection in crossbred bovine calves as determined by real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 158-161, 2008.
- ISHIZAKI, H.; HANAFUSA, Y.; KARIYA, Y. Influence of truck transportation on the function of bronchoalveolar lavage fluid cells in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, p. 67-74, 2005.
- KABARA, E.; SORDILLO, L. M.; HOLCOMBE, S.; CONTRERAS, A. Adiponectin links adipose tissue function and monocytes inflammatory response during bovine metabolic stress. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, p. 49-58, 2014.

- KALINA, W. V.; WOOLUMS, A. R.; GERSHWIN, L. J. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine influences antibody levels in bronchoalveolar lavage fluid and disease outcome in experimentally infected calves. **Vaccine**, v. 23, p. 4625-4630, 2005.
- KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J. A.; FRANK, D. E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, n. 1-2, p. 405-414, 2004.
- KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47-55, 2004.
- KERESZTES, G.; TAKACS, L.; VILMOS, P.; KURUCZ, E.; ANDO, I. Monoclonal antibodies detecting components of the bovine immune system in formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue specimens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, p. 383-392, 1996.
- KIDD, P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 232-246, 2003.
- KIMMAN T. G.; WESTERNBRICK, F.; STRAVER, P. J.; VAN ZAANEUDER, B. E. ISCHRE, D. Specific ELISAs for detection respiratory syncytial virus. **Research in Veterinary Science**, v. 43, n. 2, p. 180-187, 1987.
- KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 225-232, 2008.
- KOBZIK, L.; GODLESKI, J. J.; BRAIN, J. D. Selective down regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-independent phagocytosis. **Journal of Immunology** v. 144, p. 4312-4319, 1990.
- LEAL, M. L. R.; BENESI, F. J.; LISBÔA, J. A. N.; COELHO, C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. Proteinograma sérico de bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 138-145, 2003.
- LEACH, R. J.; ONEILL, R. G.; FITZPATRICK, J. L.; WILLIAMS, J. L.; GLASS, E. J. Quantitative trait loci associated with immune response to a bovine respiratory syncytial virus vaccine. **Plos one**, v. 7, n. 3, e. 33526, 2012.
- LIGGITT, H. D. Defense mechanism in the bovine lung. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 1, n. 2, p. 347-366, 1985.
- LOHMANN-MATTHES, M. L.; STEINMÜLLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 7, p. 1678-1689, 1994.
- MA, J.L.; ZHU, Y. H.; ZHANG, L.; ZHUGE, Z. Y.; LIU, P. Q.; YAN, X. D.; GAO, H. S.; WANG, J. F. Serum concentration and mRNA expression in milk somatic cells of toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, and cytokines in dairy cows following intramammary

inoculation with *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5903 – 5912, 2011

MACHUGH, D. E.; TARAKTSOGLU, M.; KILLICK, K. E.; NALPAS, N. C.; BROWNE, J. A. Pan-genomic analysis of bovine monocyte-derived macrophage gene expression in response to in vitro infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. **Vet. Res.**, v. 43, n. 25, p.1-19, 2012.

MEYER, G.; DEPLANCHE, M.; SCHELCHER, F. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious**, v. 31, p. 191–225, 2008

MENA, A.; IOANNOU, X. P.; KESSEL, A. V.; DEN HURK, S. V. L.; POOWYCH, Y.; BABIUK, L. A.; GODSON, D. L. Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real time PCR. **Journal of immunological methods**. v. 263, p.11-21, 2002.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Review Immunology**. v. 8, n. 12, p.958–969, 2008.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 323–42, 2006.

OHTSUKA, H.; KOBAYASHI, H.; KINOUCHI, M.; MAEDA, Y. Comparison of cytokine mRNA expression in peripheral CD4, CD8, $\gamma\delta$ T cells between healthy Holstein and Japanese Black calves. **Journal Animal Science**, v. 85, n. 5, p.575–580, 2014.

PAULETTI, P.; MACHADO NETO, R.; PACKER, I. U.; BESSI, R. Avaliação de níveis séricos de imunoglobulina, proteína e o desempenho de bezerras da raça holandesa. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 89-94, 2002.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p.1-10, 2002.

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

PEIXOTO, A. P. C.; COSTA, J. N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; SAITO, M. E. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2002.

PRADO, M. E.; PRADO, T. M.; PAYTON, M.; CONFER, A. W. Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 301-307, 2006.

PRINGLE, J. K.; VIEL, L.; SHEWEN, P. E.; WILLOUGHBY, R. A.; MARTIN, S. W.; VALLI, V. E. O. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected

normal calves: Cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and hitological variables. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 2, p. 239-248, 1988.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças do sistema respiratório. In: RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos Caprinos e Equinos. 9º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 337-427.

RAIDAL, S. L.; BAILY, G. D.; LOVE, D. N. Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophil function. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p. 433-438, 1997.

RAIDAL, S. L; BAILEY, G. D.; LOVE, D. N. The Flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. **The Veterinary Journal**, v. 156, p .107-116, 1998.

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 the neonatal immune system I. Effects on monocyte lineage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p.186–196, 2008.

RENNARD, S. I.; BASSET, G.; LECOSSIER, D.; O'DONNELL, M.; PINKSTON, P.; MARTIN, P. G.; CRYSTAL, R. G. Estimation of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as a marker of dilution. **Journal Applied of Physiology**, v. 60, p. 532-538, 1986.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow Cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 47, p. 440-448, 1990.

SAMPAIO, I. B. M. 1998. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2. ed. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Zootecnia, UFMG, 1998, 221 p.

SANTRA, A. K.; PACHALAG, S. V. Mortality pattern in crossbred calves. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 66, n. 3, p. 237-238, 1996.

SCHALM, O.W. Veterinary **HEMATOLOGY**. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea and Febinger, 1965:202, 1968.

SINDRILARU, A.; PETERS, T.; WIESCHALKA, S.; BAICAN, C.; BAICAN, A.; PETER, H.; HAINZL, A.; SCHATZ, S.; QI, Y.; SCHLECHT, A.; WEISS, J. M.; WLASCHEK, M.; SUNDERKÖTTER, C.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **Journal Clinical Investigation**. v. 121, n. 3, p. 985–997, 2011. doi:10.1172/JCI44490.

SHI, E.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation . **Immunology**, v. 11, p .762-774, 2011.

- SNOWDER, G. D.; VAN VLECK, L. D.; CUNDIFF, L. V.; BENNETT, G. L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. **Journal Animal Science**, v. 84, p. 1999-2008, 2006.
- SOETHOUT, E. C.; MÜLLER, K. E.; VAN DEN BELT, A. J. M.; RUTTEN, V. P. M. G. Identification and Phenotyping of Leukocytes in Bovine Bronchoalveolar Lavage Fluid. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 795-798, 2004.
- SOUZA, F.N. **Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta immune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SOUZA, M.; AZEVEDO, M. S. P.; JUNG, K.; CHEETHAM, S.; SAIF, L. J. Pathogenesis and Immune Responses in Genogroup II.4-HS66 Strain of Human Gnotobiotic Calves after Infection with the Norovirus. **Journal of Virology**, v. 82, p. 4, p.1777-1786, 2008.
- STEILER, J.; BERNARDO, B. S.; DONOVAN, G.N. Neutrophil and monocyte function in neonatal dairy calves fed fresh or frozen colostrum. **Internal Journal Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 10, n. 4, p. 328-334, 2012.
- STRECK, R. J.; JEZEWSKI, H. M.; RODRIGUEZ, M. I.; HURLEY, E. L.; RICH, G. A.; BRAUN, K. M.; PAULY, J.M. A method for isolating human lung macrophages and observations of fluorescent phagocytes from the lungs of habitual cigarette smokers. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, p. 67-82, 1994
- TARAKTSOGLU, M.; SZALABSKA, U.; MAGEE, D. A.; BROWNE, J.A.; SWEENEY, T. Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived Macrophages exposed to bacterial antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 140, p. 130–139, 2011.
- TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 8. ed. Londres; Elsevier, 2009, 574 p.
- THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3.ed Boston, Butterworths, 2014, 280 p.
- VARELLA, P. P. V.; FORTES, W. C. N. Citocinas:revisão. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**.v.24, p.146-14, 2001.
- VELILLA, P. A.; RUGELES, M. T.; CHOUGNET, C. A. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. **Clinical Immunology**, v. 121, p. 251-259, 2006.
- VETTORATO, E. D.; COSTA, M. C. ; FLAIBAN, K. K.; BALARIN, M. R. S.; VIDOTTO, O.; LISBOA, J. A. N. Variação de proteínas séricas em bezerros das raças nelore e holandesa do nascimento até os seis meses de vida. **Semina: ciências agrárias**, v. 33, n. 2, p. 3181-3190, 2012.
- VOEHRINGER, D.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY R.M. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL4 production. **Immunity**, v. 20, p. 267-277, 2004.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Schalm's veterinary hematology, 6 ed, Iowa: Blackwell Publishing Ltda, 2010. 1206p.