UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ESTIMULADA POR VACINA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR CONTRA VIROSES RESPIRATÓRIAS BOVINAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PATRICIA SANTOS ROSSI

GUARAPUAVA-PR

2019

PATRICIA SANTOS ROSSI

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ESTIMULADA POR VACINA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR CONTRA VIROSES RESPIRATÓRIAS BOVINAS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Heloisa Godoi Bertagnon

GUARAPUAVA-PR

2019

Catalogação na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Santa Cruz

R831c

Rossi, Patricia Santos
Comparação da resposta imune estimulada por vacina intranasal e intramuscular contra viroses respiratórias bovinas / Patricia Santos Rossi. – – Guarapuava, 2019.
xii, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, 2019

Orientadora: Heloisa Godoi Bertagnon
Banca examinadora: Heloisa Godoi Bertagnon, Renata Caminha Gomes, Giuliana G. Kasecker Botelho

Bibliografia

1. Ciências Veterinárias. 2. Macrófagos alveolares. 3. Neutrófilos. 4. Espécies reativas de oxigênio (ERO). 5. Imunoglobulina IgA. 6. Bovinos. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636.089

Patricia Santos Rossi

Comparação da resposta imune estimulada por vacina intranasal e intramuscular contra viroses respiratórias bovinas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 15 de Fevereiro de 2019.

Profª. Drª. Heloísa Godoi Bertagnon

(UNICENTRO)

Profª. Drª. Renata Caminha Gomes

(UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI)

Profª. Drª. Giuliana G. Kasecker Botelho

(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR

2019

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO CEUA

Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 020/2017 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 02 de junho de 2017.

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: *"Comparação da resposta imune estimulada por vacina intrasanal e intramuscular contra viroses respiratórias bovinas"*, protocolo número 018/2017, foi analisado e considerado **APROVADO,** pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária do dia 02 de junho de 2017.

2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

□ Os ***Relatórios Parciais*** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.

□ Os ***Relatórios Finais*** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa.**

□ **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Profª. Heloisa Godoi Bertagnon
Atenciosamente,

Larissa S. Bernardi
Presidente do CEUA

Ao senhor
Profª. Heloisa Godoi Bertagnon.
UNICENTRO-CEDETEG

A minha família, meu namorado, amigos e
colegas que me apoiaram sempre!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos derramadas em minha vida, sem sua força e seu amor nada disso seria possível. Obrigada por me conceder força, perseverança, sabedoria e por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais que tanto amo Pedro e Noeli, agradeço por toda educação, apoio, amor e confiança. Tudo que sou e tudo que faço ofereço a vocês.

Agradeço aos meus irmãos Everton, Eliane e Evandrei por estarem ao meu lado em todos os momentos. E a todos meus familiares das famílias Rossi, Santos e Warmling que torceram por mim e me apoiaram.

Ao meu namorado Willian pela paciência, pela ajuda e carinho em todos os momentos em mais uma etapa que vencemos juntos.

A minha orientadora Heloisa Godoi Bertagnon, por todos os ensinamentos e paciência comigo, no decorrer dessa caminhada. Não existem palavras suficientes para dizer o quanto a admiro como profissional e como pessoa.

Aos meus colegas de projeto em especial Rafael, Natali, Gabriela, Anna Victoria e a todos os estagiários que auxiliaram nesse trabalho, sem vocês não conseguiríamos desenvolver as atividades. Levarei todos em meu coração.

Agradeço infinitamente a todos os professores que contribuíram com seu conhecimento e dedicação, para que fosse possível a conclusão desta etapa de aprimoramento profissional.

Finalmente agradeço aos animais, tudo que realizamos só tem sentido pela existência desses seres abençoados, com os quais amo tanto trabalhar. Obrigada aos bovinos que participaram dessa jornada comigo.

As criaturas que habitam esta terra em que vivemos, sejam elas seres humanos ou animais, estão aqui para contribuir, cada uma com sua maneira peculiar, para a beleza e a prosperidade do mundo.
'Dalai Lama'

RESUMO

Patricia Santos Rossi. Comparação da Resposta Imune Estimulada por Vacina Intranasal e Intramuscular Contra Viroses Respiratórias Bovinas 2018. 75f. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Guarapuava.

Devido ao impacto econômico de doenças do complexo respiratório em bovinos (CRB), o mercado mundial tem lançado propostas para o controle desta enfermidade, investindo principalmente vacinas comerciais. Dentre as vacinas existentes no mercado, ainda não há um consenso sobre qual melhor via de administração, pois as vacinas intranasais estimulam maior resposta humoral, mas parecem impactar a defesa celular pulmonar por mimetizarem uma infecção viral tênue, enquanto as vacinas intramusculares interferem menos em ambas respostas imunes. Desta maneira o presente trabalho verificou o impactos de duas destas vacinas comercias na irritação, no perfil citológico, no metabolismo oxidativo celular e na produção de imunoglobulina IgA da região broncoalveolar, em 16 bezerras Jersey sadias, (18 ±2 meses), conforme os grupos controle (CO) (n=5); intranasal (IN) (n=7) e intramuscular (IM) (n=5). O grupo IM apresentou irritação em nasofaringe e, redução significativa de macrófagos alveolares 7 dias após a vacinação e não alterou a produção de IgA. O grupo IN apresentou irritação em nasofaringe, aumento de celularidade por aumento de neutrófilos e redução de macrófagos e redução do metabolismo oxidativo celular da região broncoalveolar nos dias 3 ao 21 após a vacinação, com maior magnitude de alterações no dia 7 e aumento significativo dos teores de IgA no três dias após a vacinação.Conclui-se que a vacina intranasal reduz a resposta imune celular, mas aumenta a resposta humoral e a vacina intramuscular promove alterações semelhantes porém mais tênues, indicando que ambas as vacinas podem aumentar a susceptibilidade para CRB, durante o estabelecimento da imunidade vacinal.

Palavras chave: Macrófagos alveolares, neutrófilos, espécies reativas de oxigênio (ERO), imunoglobulina IgA, bovinos.

ABSTRACT

ROSSI, Patricia Santos. **Comparison of Immune Response Stimulated by Intranasal and Intramuscular Vaccine Against Bovine Respiratory Viruses**. 2018. 75f. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Guarapuava.

The worldwide impact on respiratory volume in cattle (CRB), the world market has been proposed for the control of nurses, investing mainly commercial vaccines. Among the vaccines available on the market, there is still no consensus on the best route of administration, since intranasal vaccines stimulate a higher humoral response, but seem to impact a cellular disease by mimicking a viral infection, whereas intramuscular vaccines interfere less in both immune responses. In this way no work was found on the impact of two vaccination works on the irritation, without cytological profile, without cellular oxidative metabolism and with the production of IgA immunoglobulin of the bronchoalveolar region, in 16 healthy Jersey calves (18±2 months), according to the control groups (CO) (n=5) intranasal (IN) (n=7) and intramuscular (IM) (n=5). The IM group presented nasopharyngeal irritation and a significant reduction of macrophages within 7 days after vaccination and did not alter IgA production. The IN group presented nasopharyngeal irritation, increase of cellularity by neutrophil increase and reduction of macrophages and reduction of the cellular oxidative metabolism of the bronchoalveolar region on days 3 to 21 after vaccination, with a greater magnitude of changes on day 7 and a significant increase of the levels of IgA within three days after vaccination.It is concluded that an intranasal vaccine reduced the cellular immune response but there is a humoral response and intramuscular vacancy can be found for CRB during the establishment of vaccine immunity**.**

Keywords: Alveolar macrophages, neutrophils, reactive oxygen species (ROS), immunoglobulin IgA, cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tipos de vacinas vivas replicativas atenuadas por diferentes métodos. Fonte: FLORES (2007).....30

Fig.1. Dias de imunização e coleta de amostras de sangue LBA dos grupos submetidos a vacina intramuscular (A) e intranasal (B). Guarapuava, 2017 676

Fig.2. Presença de IgA em lavado broncoalveolar (LBA) de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017 67

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Presença de irritação em mucosa do trato respiratório de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017 63

Quadro 2. Valores totais e porcentagem das células broncoalveolares, de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017 64

Quadro 3. Metabolismo oxidativo de células broncoalvelares de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017 65

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Porcento

>- Maior

≤- Menor ou igual

BoHV-1- Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

bPIV-3-Vírus da Parainfluenza bovina tipo 3

BRSV-Vírus Sincicial Respiratório Bovinas

BVDV - Vírus da Diarreia Viral Bovina

CO- Grupo controle

CP- Citopático

CRB- Complexo respiratório bovino

DM- Doencas das mucosas

EROs- Espescies reativas de oxigênio

γ-Gama

IBR- Rinotraqueíte infecciosa bovina

IFNs- Interferons

IL- Interleucina

IM – Grupo intramuscular

IN – Grupo intransal

kg – Quilograma

mg – Miligrama

mL- Mililitro

NCP- Não citopático

PI- Persistentemente infectado

SC- Subcutâneo

Tc- Linfócito T citotóxico

Th- Lonfocitos T auxiliares sou helper

TNFα- Fator de necrose tumoral

UI- Unidades internacionais

VVM- Vírus vivo modificado

α- Alfa

β- Beta

µl -Microlitros

SUMÁRIO

1.**INTRODUÇÃO** 14
2.**REVISÃO DE LITERATURA** 17
2.1. Complexo respiratório bovino 17
2.2.Vírus envolvidos no complexo respiratorio bovino e gravidade das pneumonias 18
2.3. Patogenia 22
2.4. Diagnóstico 24
2.5. Tratamento 26
2.6. Formas de controle do CRB 27
2.7.Vacinas comerciais 28
2.8. Imunologia 33
2.8.1. Resposta imune geral 33
2.8.2. Resposta imune do trato respiratório 35
3.REFERÊNCIAS 39
4. ARTIGO 55
ANEXOS 68
Anexo1. Normas de submissão para revista 68
Anexo2. Hemograma de bovinos da raça Jersey 73
Anexo3. Valores de IgA 74

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho bovino de 215,2 milhões de cabeças (IBGE, 2015). Neste cenário, a sanidade dos bovinos é um importante fator na mantença da produtividade nacional. Dentre as principais afecções que acometem esses animais, o complexo respiratório bovino (CRB) também denominado pneumonia enzoótica bovina causa grandes prejuízos neste setor agropecuário (EDWARDS, 2010). Em rebanhos leiteiros, a doença é responsável por uma alta mortalidade de bezerros de até um ano de idade (BRASIL et al., 2013), gerando despesas por óbitos de animais com genética superior, além de custos com tratamentos em torno de $5-10/ 100 kg de peso vivo (PATRICK, 2009).

O CRB é uma enfermidade multifatorial relacionada a uma interação complexa entre fatores estressores ambientais, suscetibilidade imune dos animais e patógenos respiratórios como os vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BoHV-1), Parainfluenza tipo 3 (bPIV-3), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) e vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) (CUSACK et al., 2003; ANDREWS et al., 2008). Esses microrganismos comprometem a barreira física de mucosas, o sistema mucociliar e a defesa celular inata (EDWARDS, 2010). Assim quando bactérias comensais do trato respiratório anterior como *Mannhemia haemolytica* e a *Pasteurella multocida* são inaladas, a reduzida defesa pulmonar permite que elas colonizem os pulmões causando pneumonia bacteriana secundária (SVENSSON e LIBERG, 2006).

A alta frequência do CRB aliada aos crescentes prejuízos econômicos advindos desta afecção estimulou o desenvolvimento de inúmeros protocolos para o controle da doença. Os mais frequentemente utilizados estão relacionados à metafilaxia, na qual os animais recebem uma dose única de antibiótico ao chegarem ao confinamento ou a profilaxia, na qual os animais recebem uma a duas doses de vacina contra patógenos respiratórios entre sete a 15 dias antes de um evento estressante, como transporte por exemplo (TAYLOR et al., 2010).

Apesar de ambas as práticas serem eficientes, a crescente preocupação com resíduos de antibióticos nos produtos de origem animal tem incentivado o uso da profilaxia vacinal contra viroses respiratórias (TAYLOR et al., 2010; ROTH, 2011).

Para o CRB estão disponíveis produtos monovalentes, polivalentes ou combinações de vacinas virais e bacterianas, sendo vivas modificadas, inativadas ou mortas. A maioria das vacinas são constituídas por complexos direcionados contra os agentes virais IBR, BVD,

bPIV-3 e BRSV, indicados para administração subcutânea (EDWARDS, 2010; LORENZ et al., 2011) ou intramuscular (NEUTRA e KOZLOWSKI, 2006).

Em relação a enfermidades do trato respiratório, as vacinas intranasais são uma alternativa em potencial, visto que não causam dor no local de aplicação e possuem capacidade de induzir resposta imune local superior à vacinação sistêmica (NEUTRA e KOZLOWSKI, 2006), propiciando imunidade no local da entrada do agente patogênico, além de poder resultar na secreção de anticorpos de forma sistêmica, bem como em outros sítios mucosos (HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005).

Apesar das vacinas intranasais promoverem uma resposta imune local mais eficiente, por estimular uma maior produção de IgA local (TIZARD, 2014; NEUTRA e KOZLOWSKI, 2006), Gomes (2016) verificou redução na porcentagem e na função de macrófagos alveolares de bezerros neonatos imunizados por esta via, sugerindo que esta via de administração possa reduzir as defesas respiratórias contra bactérias.

Tal fato pode ocorrer porque a vacina promove resposta imunológica semelhante a que ocorre na infecção viral natural (DOU et al., 2015), gerando-se a dúvida se a vacina intranasal pode predispor a maior susceptibilidade de infecções bacterianas secundárias durante o período do estabelecimento desta imunidade, que acontece entre 1 a 3 semanas após a segunda dose da vacinação (GOMES et al., 2015).

Como a aplicação por via intranasal é uma prática laboriosa, preconiza-se a administração parenteral em grandes rebanhos (FULTON et al., 2003). Estas vacinas intramusculares ou subcutâneas são efetivas no controle do CRB, pois estimulam também resposta imune local, mesmo que em menor proporção em relação à administração intranasal (NEUTRA e KOZLOWSKI, 2006). Como este desafio para a mucosa nasal é menor, acredita-se que afete menos a efetividade celular do trato respiratório, resultando possivelmente em menor susceptibilidade a infecções bacterianas secundarias durante o período de desafio vacinal.

Apesar das vantagens retromencionadas, Fulton et al. (2003) verificaram que bovinos imunizados com vírus vivo modificado contendo BoHV1 e BVDV1 por via intramuscular apresentaram viremia entre 3 a 7 dias após a segunda dose vacinal. Apesar dos animais apresentarem aumento de secreção nasal, não eliminaram vírus, nem contaminaram outros animais não vacinados do rebanho. Infelizmente nesta pesquisa não foram estudada as populações celulares broncoalveolares nem suas funções, mas se houve aumento de secreções

nasais existe a possibilidade também desta via de vacinação comprometer as funções imunes das células broncoalveolares.

Embora muitas pesquisas já tenham sido realizadas com diferentes vias de administração vacinal contra viroses respiratórias, a atenção principal é para produção de anticorpos e soroneutralização, e quase nenhuma delas foca nos efeitos da vacina sobre as células broncoalveolares (GERSHWIN et al., 1998; FULTON et al., 2003; ELLIS et al., 2007; XUE et al., 2010). Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo comparar os efeitos das vacinas intranasal e intramuscular contra CRB no perfil e função das células pulmonares e na produção de imunoglobulina IgA inespecífica pulmonar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Complexo respiratório bovino

O CRB causa grandes prejuízos para a cadeia produtiva bovina. Esta enfermidade é multifatorial, sendo resultado da combinação complexa entre manejos inadequados, fragilidade do sistema imune e presença de agentes infecciosos virais e bacterianos no trato respiratório de bovinos (ANDREWS et al., 2008; EDWARDS, 2010).

Animais que possuem um sistema imune hígido são mais resistentes à afecções e tem melhor desempenho produtivo (BURTON, 1995). A incidência de enfermidades em bovinos de leite ou de corte, aumenta durante os períodos de elevado estresse, como o desmame precoce, restrição de água, super lotação animal, pico de lactação e transporte (CHANG e MOWAT,1992).

Condições estressantes aumentam os níveis plasmáticos de cortisol, esse hormônio influência diretamente sobre a imunidade sanguínea e respiratória. Em relação ao trato respiratório, quando bovinos estão sob estresse ocorre alteração na citologia desse sistema, além de redução na ativação e poder de fagocitose de macrófagos e neutrófilos alveolares, aumentando a suscetibilidade a doenças respiratórias nos animais (HENRICKS et al.,1987; ISHIZAKI et al., 2005; ACKERMAN, 2010; BERTAGNON et al., 2011).

Os principais agentes virais que atuam no CRB são os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV-1), parainfluenza bovina tipo 3 (bPIV-3), vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (ANDREWS et al., 2008; ACKERMAN et al., 2010; EDWARDS, 2010). Estes agentes comprometem a defesa imune pulmonar afetando principalmente a função do aparelho mucociliar e reduzindo a capacidade fagocítica de macrófagos alveolares e linfócitos (FILLION et al., 1984; LIGGITT et al., 1985; ADAIR et al., 1991; EDWARDS, 2010), predispondo o sistema respiratório a infecções bacterianas secundarias por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*; *Histophilus somni* ou *Mycoplasma bovis,* agentes esses comensais das fossas nasais de bovinos sadios (ACKERMAN et al., 2010; EDWARDS, 2010).

2.2.Vírus envolvidos no complexo respiratorio bovino e gravidade das pneumonias

Os vírus (BoHV-1), (bPIV-3), (BRSV) e (BVDV), comprometem o sistemas de defesa do hospedeiro, o que promove o aumento da incidência de pneumonias bacterianas graves (ANDREWS et al., 2008; EDWARDS, 2010).

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) é causada pelo BoHV-1, que é membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesviridae*. Esse agente viral está amplamente disseminado no país chegando a acometer 82% do rebanho nacional, causando prejuízos consideráveis por causar doenças respiratórias, genitais e abortos em bovinos. Dentro da família *Herpesviridae* ainda tem-se o *Herpesvírus bovino* tipo 2 (BoHV-2) relacionado a mamilite herpética e o *Herpesvírus bovino* tipo 5 (BoHV-5) causador da encefalite herpética (FLORES, 2007).

O BoHV-1 possui a característica de manter-se em latência no hospedeiro, permanecendo nos gânglios trigêmeo e sacral. A infecção latente pode ser reativada após os animais passarem por condições de estresse como aglomeração de animais, transporte, confinamento, pós-parto ou administração de corticosteroides (KAPIL e BASARABA 1997; MUYLKENS et al., 2007). Em um plantel a IBR pode alcançar uma morbidade de até 100% e uma taxa de letalidade próximo de 5%. A gravidade da doença aumenta quando ocorre infecções bacterianas secundárias no sistema respiratório (FLORES, 2007).

Pústulas e placas diftéricas podem ser observadas na mucosa nasal externa e interna, em nasofaringe, traqueia e brônquios. Se a infecção viral não se resolver até dez dias, agentes bacterianos podem invadir as vias respiratórias e causar broncopneumonia grave (KAPIL e BASARABA 1997).

O Vírus bPIV-3 pertence a família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Respirovirus*, causa infecções respiratórias em bovinos e ovinos. No Brasil a sua distribuição é ampla, com altas taxas de soropositividade nos rebanhos (FLORES, 2007). Em estudo realizado no Paraná de 714 amostras de sangue bovino avaliados foi constatado a presença de bPIV-3 em 80,4% das amostras, estando o agente presente em 96 % das 26 propriedades investigadas (SPONCHIADO, 2014).

Esse agente é um dos causadores de sinais clínicos de pneumonia, após bovinos serem transportados por longas distâncias, podendo o bPIV-3 estar relacionado ou não a outros agentes, como a *M. hemolytica* e *P. multocida* (KAPIL e BASARABA, 1997). Os sinais clínicos iniciais da infecção podem ser dispnéia, tosse, descarga nasal serosa ou

mucopurulenta, lacrimejamento, conjuntivite, inapetência e temperatura elevada. A maioria dos animais manifestam sinais clínicos discretos, recuperando-se em poucos dias, no entanto a infecção pode culminar em pneumonia intersticial, acometendo os lobos pulmonares anteriores (FLORES, 2007).

O BRSV pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* desempenha um papel fundamental na doença respiratória dos bovinos, causando broquiolite e pneumonia intersticial (FLORES, 2007). A infecção por BRSV é presente no Brasil, Sponchiado (2014) relatou que de 714 bovinos testados 93,5% foram sororreagentes para BRSV em levantamento realizado na região sul do país. Porém, ainda são escassas as pesquisas realizadas para estabelecer a prevalência de BRSV nos rebanhos brasileiros.

Esse agente comumente participa com outros vírus ou bactérias como *M. haemolytica*, *P. multocida* e *H. somni* no estabelecimento do CRB. A infecção por BRSV no sistema respiratório pode causar desde uma sintomatologia inaparente a pneumonias graves, sendo mais severa em bezerros jovens entre um e cinco meses de vida (FRASER, 1996; FLORES, 2007).

Os sinais clínicos após a infecção natural pelo BRSV incluem febre, descarga nasal, tosse, taquipnéia, respiração bucal e abdominal, enfisema pulmonar e até óbito do animal. Se não ocorrerm infecções bacterianas secundárias, os animais se recuperam rapidamente em até três semanas. Se o animal vier a óbito, as lesões observadas na necropsia são pneumonia intersticial multifocal, enfisema alveolar disseminado com focos de atelectasia, enfisema intersticial em graus moderados e espessamento dos septos interlobulares (FLORES, 2007).

O BVDV é pertencente à familia *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*, este agente tem a capacidade de acometer bovinos, ovinos e suínos sendo responsável por perdas econômicas consideráveis pela redução nos índices reprodutivos, na produção leiteira, no desempenho em confinamento e custo com tratamentos (FLORES, 2007, FULTON, 2009). Estudos sorológicos demonstraram que o BVDV encontra-se amplamente difundido no rebanho bovino brasileiro, podendo variar de 64 até 96% a sua prevalência nos rebanhos nacionais (QUINCOZES et al., 2007 ;MENDES et al., 2009; SILVA et al., 2009).

De acordo com as características genéticas e antigênicas, os isolados podem ser divididos em dois grupos: BVDV-1 e BVDV-2. Os vírus pertencentes ao genótipo 1 abrangem a maioria das cepas de referência e são os vírus utilizados em vacinas, os mais frequentemente isolados e possuem virulência baixa a moderada. Os vírus pertencentes ao

genótipo 2 foram inicialmente isolados de surtos de BVDV aguda e doença hemorrágica, mas também já foram isolados apresentando virulência baixa a moderada (FLORES, 2007).

A infecção por BVDV pode ter caráter agudo ou persistente. A infecção persistente é resultante da habilidade desses vírus em atravessar a placenta e estabelecer infecção e imunotolerância no feto. A infecção transplacentária, é seguida do nascimento de animais persistentemente infectados (PI), os quais podem desenvolver uma enfermidade denominada doença das mucosas (DM) que acomete apenas animais PI (FLORES, 2007; FINO et al., 2012).

Esses indivíduos são os principais reservatórios e disseminadores do vírus, pois o excretam continuamente pelas secreções (nasais, saliva, sêmen, leite) e excreções (urina, fezes). A transmissão do BVDV se da principalmente por contato direto (focinho-focinho, monta natural) e indireto (contato entre mucosa nasal com secreções, excreções, feto abortado ou restos de placenta). A transmissão iatrogênica ocorre por contato com agulhas ou instrumentais cirúrgicos contaminados, luvas de palpação, tatuadores, aplicadores de brinco e sêmen contaminado. A transmissão vertical aos embriões/fetos é frequente quando ocorre infecção de vacas durante a gestação (FLORES, 2007; OTONEL et al., 2014).

Há dois biótipos virais de BVDV, de acordo com a ação produzida em cultura celular, o biótipo citopático (CP) e o não-citopático (NCP). O NCP é o único com capacidade de atravessar a barreira placentária e infectar o feto, causando doenças congênitas e problemas reprodutivos. Já o biótipo CP é correlacionado como causador da DM em PI. Se o vírus infectar o feto durante 45 a 125 dias de gestação é comum ocorrer morte fetal, abortos, ou o nascimento de bezerros PI, se a infecção for a partir dos 125-175 dias de gestação ocorre mal formações congênitas, como hipoplasia cerebelar e deficiência ocular de grau variado, sendo incomum nascimento de bezerros PI (RADOSTITS et al., 2002; FINO et al., 2012).

O BVDV também contribui para a ocorrência de pneumonias causadas por agentes bacterianos devido à sua ação imunossupressora, de modo que, se realizada prevenção da infecção por BVDV nos animais, também se reduz a incidencia de infeções respiratórias no plantel (BASQUEIRA et al., 2017).

Independentemente dos agentes envolvidos, as doenças respiratórias causam alta taxa de morbidade entre os bovinos. A exposição dos animais a fatores como transporte, alterações bruscas de temperatura e umidade, ambientes com baixa ventilação, presença de gases nocivos que se somados somados às particularidades do trato respiratório dos bovinos e à

ação patogênica de agente virais e bacterianos, culminam para que ocorram as pneumonias (SNOWDER et al., 2006).

As enfermidades do trato respiratório resultam em elevadas perdas econômicas devido à alta morbidade e mortalidade nos rebanhos. Em geral os custos são decorrentes de conversão alimentar ineficiente, perda de peso, condenações de carcaças no abate, tratamento e óbito de animais (SNOWDER et al., 2006; BRASIL et al., 2013).

Em levantamento realizado na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil et al. (2013) relataram que os surtos de pneumonia acometeram com maior frequência bezerros de raças de leiteiras, provavelmente pelo estresse do desmame precoce, e agrupamento dos animais. Já em outros países como o Canadá, esta enfermidade é comumente relatada em bovinos de corte confinados, que passam por transportes, alterações ambientais ou permanecem em alojamentos mal ventilados (BOOKER et al., 2008; EDWARDS, 2010; LORENZ et al., 2011). Podendo se sugerir que o CRB está relacionado aos manejos de desafio e estresse que os animais passam e não a sua aptidão de produção (BRASIL et al., 2013).

Em bovinos as taxas de morbidade do CRB são variáveis, entre 5 a 50%, podendo chegar até 100%, dependendo dos fatores de predisposição na propriedade, enquanto a taxa de mortalidade pode chegar a aproximadamente 30% (BRASIL et al., 2013). As perdas econômicas associadas a essa enfermidade em animais de confinamento são estimadas em aproximadamente US $ 13,90 por animal, não somando a esse valor custos com mão-de-obra e manejos diários associados (SNOWDER et al., 2006). Além disso, Loneragan et al. (2001) constataram que as doenças respiratórias levaram à diminuição da qualidade da carcaça e decréscimo expressivo no ganho de peso de animais confinados (0,07-0,20 kg/animal/dia).

Watts e Sweeney, (2010) relataram que o impacto econômico global do CRB esta estimado em aproximadamente US$ 3 bilhões por ano. Recentemente estimou-se que as perdas relacionadas à morbidade foram de US$ 6,31 milhões/ano, e de US$ 5,54 milhões em relação à mortalidade, resultando em prejuízo anual de US$ 11,85 milhões no Brasil. Ressalta-se também que a maior ocorrência de coinfecções nas pneumonias de bovinos foram correlacionadas a infecções virais e bacterianas com o envolvimento de *M. haemolytica* e *P. multocida*, as quais foram identificadas em 4/5 novilhos testados (BAPTISTA et al., 2017). No entanto ainda se fazem necessários mais estudos relacionados aos custos econômicos que o CRB e as consequentes pneumonias causam nos rebanhos nacionais (BRASIL et al., 2013; BAPTISTA et al., 2017).

2.3. Patogenia

O conceito fundamental da patogênese do CRB em bovinos é bem definido. Os animais que desenvolvem esta enfermidade passam por algum estressse que leva a imunossupressão, expondo-se assim a agentes virais como o BoHV-1, bPIV-3, BRSV BVDV, que também possuem capacidade imunossupressora, permitindo que agentes bacterianos comensais do trato respiratório migrem e colonizem a via respiratória inferior, acarretando no estabelecimento de pneumonias graves (EDWARDS, 2010; MOSIER, 2014).

Situações como transportes por longas distâncias, alterações ambientais, permanência em locais pobremente ventilados, desmame precoce, restrição de água, superlotação animal e pico de lactação debilitam as respostas imunológicas de bovinos de aptidão leiteira ou de corte, favorecendo o estabelecimento das doenças respiratórias bovinas (CHANG e MOWAT, 1992; BOOKER et al. 2008; EDWARDS, 2010; BRASIL et al., 2013).

Os bovinos possuem características anatômicas e fisiológicas, como um grande volume de espaço morto que permite a deposição de partículas e deixando o fluxo de vapores e gases mais lento, além de uma reduzida ventilação colateral, tornando-se esta espécie mais suscetível a pneumonias (ACKERMAN e BROGDEN, 2000; ACKERMAN et al., 2010).

O trato respiratório permite que o ar percorra livremente em contato com sua mucosa até os alvéolos, precisando assim de sistemas de defesa competentes para manter-se hígido. O lençol mucociliar e a defesa celular realizada por macrófagos alveolares e neutrófilos são uns dos principais mecanismos que garantem a saúde desse sistema (BURTON et al., 2005; ACKERMANN et al., 2010; SANTOS e ALESSI, 2016).

O muco produzido pelo sistema respiratório é composto por moléculas solúveis, como lisozima, lactoferrina, proteínas surfactantes e peptídeos catiônicos, como as defensinas e as catelicidinas. Esse muco engloba partículas estranhas que são carreadas constantemente através dos movimentos ciliares dos bronquíolos até a traqueia, ou em sentido contrario, da cavidade nasal para a faringe, onde o muco é deglutido sendo digerido no trato digestório. As partículas que escapam desse sistema atingem os alvéolos sendo fagocitadas pelos macrófagos alveolares e neutrófilos (BURTON et al., 2005; TIZARD, 2014).

Os vírus no CRB acometem as defesas do sistema respiratório através de dois mecanismos principais. O primeiro é interferindo na barreira física, alterando e lesionando as

superfícies das mucosas, causando danos às células epiteliais da mucosa nasal e alterando a depuração mucociliar, permitindo fixação, crescimento e colonização bacterina (CONFER, 2009; FULTON, 2009). O segundo é interferindo nas defesas imunes inatas prejudicando a função de macrófagos e neutrófilos e respostas adaptativas, por meio da supressão de linfócitos T e B (SRIKUMARAN et al., 2007; FULTON, 2009).

O BoHV-1 causa erosões e úlceras no trato respiratório superior, e sua infecção, *in vivo* ou *in vitro*, causa a lise das células epiteliais respiratórias infectadas, levando a morte celular por necrose e apoptose, inteferindo na depuração mucosa (MUYLKENS et al., 2007). Também o vírus BoHV-1 leva à indução de apoptose de linfócitos T auxiliares (Th) $CD4^{+}$, prejudicando a liberação de citocinas que promovem o desenvolvimento das respostas imunes humorais e celulares. Hodgson et al. (2005) relataram mecanismos de sinergia viral-bacteriana entre o BoHV-1 o qual alterou a expressão de receptores tipo *Toll* (Toll like receptors-TLR) e respostas pró-inflamatórias, o que contribuiu para ocorrer a infecção por *M. haemolytica*. Esses fatos contribuem para a migração e a colonização do trato respiratório inferior, por patógenos bacterianos comensais das vias aéreas em animais saudáveis, levando à ocorrência de pneumonias (SRIKUMARAM et al., 2007).

O vírus BVDV é constantemente associado à imunossupressão, contribuindo para o desenvolvimento de infecções respiratórias bacterianas secundárias no organismo hospedeiro. Esse agente acomete os macrófagos alveolares, levando a redução na produção e liberação de ânion superóxido $O2^{-}$ e de fator de necrose tumoral (TNF-α) por essas células, além induzir a apoptose de linfócitos T e B *in vivo* (ADLER et al., 1994; CHASE et al., 2004; CHASE et al.,2015).

Os vírus BoHV-1 e BVDV, também comprometem a produção dos interferons (IFNs). Essas citocinas atuam no controle e na replicação celular, além de serem fundamentais na defesa antiviral. Os IFNs tipo I (α e β) são produzidos por vários tipos de células enquanto o IFN tipo II (γ) é produzido principalmente por linfócitos T (FLORES, 2007; SRIKUMARAN et al., 2007). Segundo Henderson et al. (2005) o BoHV-1 possui a capacidade de antagonizar a resposta dos IFNs após a infecção. Já em relação ao BVDV, estudos em cultura celular revelaram que cepas NCP e CP, não foram capazes de induzir respostas de IFNs do tipo I detectáveis, evitando assim a estimulação das respostas imunes inatas (BAIGENT et al., 2002; GIL et al., 2006).

O vírus bPIV-3 replica-se em células epiteliais de todo trato respiratório, porém causa maiores danos principalmente na parte inferior do sistema, provocando bronquite, bronquiolite e alveolite. Durante a fase aguda da infecção pelo bPIV-3, ocorre necrose de células epiteliais bronquiolares, e destruição de células ciliadas prejudicando todo o sistema de depuração mucociliar. O agente viral também acomete os macrófagos alveolares, inibindo sua produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), prejudicando a função bactericida dessas células (BRYSON et al., 1983; BRYSON, 1985; DYER et al., 1994).

O BRSV é uma importante causa do CRB em bezerros jovens (GUZMAN e TAYLOR, 2015). O BRSV se replica principalmente em células epiteliais das vias aéreas ciliadas e pneumócitos tipo II (VIUFF et al., 1996) e induzem uma grande liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que direcionam a expressão de moléculas de adesão celular e recrutam neutrófilos e linfócitos para o pulmão, resultando em bronquiolite e pneumonia intersticial (ROSENBERG e DOMACHOWSKE, 2012).

Em estudo recente, foi relatado que a infecção por BRSV em células epiteliais respiratórias aumentou a aderência de *P. multocida* a essas células, ocorrendo concomitantemente um aumento da expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias exarcebando a resposta inflamatória aguda local, contribuindo assim, para explicação dos graves sintomas pneumônicos do CRB quando envolve esse agente viral (SUDARYATMA et al., 2018).

Os patógenos envolvidos no CRB desenvolveram uma variedade de mecanismos de evasão e imunossupressão do sistema imunológico, durante o estabelecimento da enfermidade, tornando o hospedeiro incapaz de desenvolver uma resposta imune protetora completamente eficiente. Essas estratégias desenvolvidas por um patógeno não só ajudam a ele mesmo, mas também os demais, resultando na exacerbação da gravidade da doença (SRIKUMARAN et al., 2007).

2.4. Diagnóstico

A detecção precoce das doenças respiratórias em bovinos é fundamental para evitar sua disseminação dentro do rebanho, no entanto na maioria das vezes esta identificação baseia-se principalmente na inspeção visual dos sinais clínicos, requerendo habilidade e experiência do responsável o que pode ser falho, visto que os ruminantes vivem em grupos na

natureza e buscam mascarar ou esconder os sinais clínicos da enfermidade como forma de autopreservação (EDWARDS, 2010). Assim aumenta-se a acurácia do diagnóstico quando além da inspeção visual, utiliza-se exame físico, análises laboratoriais e necropsia (SNOWDER et al., 2006; EDWARDS, 2010)

Os sinais clínicos no período inicial do CRB podem ser vagos e de difícil constatação, precisando ser observados atentamente os animais com anormalidade nos seus padrões de comportamento específicos. Os sinais clínicos mais comuns de doenças respiratórias bovinas incluem depressão, emagrecimento, letargia, respiração ofegante ou acelerada, focinho seco, orelha caída, pêlos ásperos, corrimento nasal seroso ou mucopurulento, decúbito e morte. Em alguns casos os animais podem apresentar dificuldade respiratória ao serem movimentados, apresentando pescoço estendido, boca aberta e salivação exacerbada. A elevação de temperatura corporal ocorre comumente relacionada à presença de infecções bacterianas secundárias (RIET-CORREA et al., 2001; EDWARDS, 2010; BRASIL et al., 2013).

Em relação ao exame físico, a auscultação e percussão pulmonar são realizadas para avaliar as alterações pulmonares. Com esses métodos é possível estabelecer o grau de desenvolvimento da lesão, e também delimitar área pulmonar acometida. Na auscultação pode se perceber a consolidação ântero-ventral dos pulmões, devido a infecções bacterianas secundárias e em porções dorso-caudais crepitação exacerbada se houver enfisema pulmonar (RADOSTITS et al., 2002; SNOWDER et al., 2006).

No entanto, o exame físico, em particular a auscultação pulmonar, nem sempre é suficiente para constatar uma doença respiratória nos quadros iniciais, assim os exames complementares se tornam essenciais. A endoscopia respiratória é um exame complementar pouco invasivo, que além de permitir a inspeção indireta do sistema respiratório, desde a cavidade nasal até a árvore brônquica (BATISTA et al., 2016), ainda permite a colheita de amostras de lavados da região respiratória, gerando informações sobre a ocorrência de afecções, sua gravidade, bem como o agente presente, baseando-se no perfil celular encontrado (GONÇALVES et al., 2004). Sabendo-se que a citologia broncoalveolar de bovinos sadios é composta por 68,80% de macrófagos, 11,10% de neutrófilos, 1,90% de linfócitos e menos de 1% de eosinófilos, conclui-se que há uma broncopneumonia bacteriana quando há aumento de neutrófilos na região, proporcionalmente à gravidade da afecção (ACKERMANN et al., 2010).

Os agentes etiológicos obtidos por lavado broncoalveolar ou traqueal, swabs nasais, materiais de lesão, amostras fecais e de soro podem então ser identificados por isolamento viral e bacteriano, reação em cadeia da polimerase (PCR), imunofluorescência, imunohistoquimica (IHC), sorologia (ELISA), exame histopatológico e microscopia eletrônica (FULTON et al., 2009). Para esses exames, o mais indicado é selecionar animas na fase aguda da enfermidade e sem antibioticoterapia prévia, porque, pode reduzir ou anular o crescimento das culturas bacterianas em laboratório (COOPER e BRODERSEN, 2010).

Análises sanguíneas podem ser realizadas para avaliar a gravidade da infecção, assim como, qual tipo de agente esta envolvido (bacteriano ou viral) (RADOSTITS et al., 2002). É possível também realizar testes quantitativos para verificação de hormônios como o cortisol, imunoglobulinas e antígenos (FULTON et al., 2003; BERTAGNON et al., 2017).

A necropsia é fundamental para identificação das pneumonias e dos agentes envolvidos nesta enfermidade, por meio da análise macroscópica das lesões, assim como, pela observação microscópica de amostras através de exames histopatológicos. Os achados de necropsia têm grande relevância para tomada de decisões na propriedade, relacionadas a manejos diários e preventivos das doenças respiratórias bovinas (EDWARS, 2010; GORDEN e PLUMMER, 2010).

2.5. Tratamento

As ações terapêuticas contra as doenças respiratórias em bovinos não são direcionadas para a infecção viral, mas sim para as infecções bacterianas secundárias. Os antimicrobianos usualmente utilizados nos casos de pneumonia são oxitetraciclina, na dose de 10 mg/kg IM, penicilina G procaína, na dose de 30.000 a 45.000 UI/kg IM, sulfa com trimetropim, na dose de 3 mL/45 kg de peso IM. Outras drogas também são altamente eficazes como a tilmicosina, na dose de 10 mg/kg subcutâneo, o florfenicol, na dose de 20 mg/kg IM em intervalos de 48 horas. Também pode-se utilizar a tulatromicina 2,5 mg/kg em dose única SC (RADOSTITS et al., 2002; CUSACK et al .,2003).

Estudos são realizados para avaliar a eficácia dos fármacos mais empregados no tratamento de pneumonia causada pelos agentes envolvidos no CRB. Viana et al. (2007) testaram a eficiência de diversos antibióticos contra *M. haemolytica* e *P.multocida*. Enrofloxacina, florfenicol, ciprofloxacina e sulfametazol/trimetropin foram os

antimicrobianos que demonstraram maior eficácia enquanto a tetraciclina teve a maior taxa de resistência.

Ainda Timsit et al. (2017) avaliaram a resistência a antimicrobianos, dos agentes *M. haemolytica*, *P. multocida* e *H. somni* presentes em animais saudáveis e acometidos por CRB. Houve altos níveis de resistência (>70%) contra a tulatromicina e oxitetraciclina em isolados de *M. haemolytica* e *P. multocida* e elevados níveis de resistência contra a oxitetraciclina (67%) e penicilina (52%) em isolados de *H. somni*. Poucos isolados bacterianos foram resistentes ao florfenicol, enrofloxacina e ceftiofur. A elevada resistência contra a tulatromicina e a oxitetraciclina sugere que esses antimicrobianos não devem ser utilizados repetidamente tanto para controle quanto para tratamento do CRB.

Magstadt et al. (2017) avaliaram a sensibilidade antimicrobiana de 1.251 isolados bacterianos de bovinos tratados e não tratados para pneumonia .Os isolados bacterianos de bovinos que receberam tratamento antimicrobiano apresentaram maior resistência a antibióticos em comparação com aos isolados de bovinos não tratados, além de que a porcentagem de isolados resistentes aumentou concomitantemente ao aumento do número de tratamentos antimicrobianos. A resistência à enrofloxacina, espectinomicina, tilmicosina e tulatromicina esteve presente em >75% dos isolados de *M. haemolytica* de bovinos que receberam três ou mais tratamentos antimicrobianos; a resistência a cada um dos quatro antimicrobianos estava presente em ≤10% dos isolados de *M. haemolytica* de bovinos não tratados. Tendências similares, mas menos dramáticas, foram evidentes para isolados de *P. multocida* e *H. somni*. A porcentagem de isolados bacterianos resistentes também aumentou com o número de tratamentos, sugerindo-se que o tratamento antimicrobiano prévio pode ter um efeito acentuado no teste de sensibilidade *in vitro*.

2.6. Formas de controle do CRB

Para reduzir os impactos negativos que o CRB causa na produção bovina, é fundamental implantar um planejamento de saúde para o rebanho, visando reduzir a incidência e os custos relacionados à morbidade e mortalidade de animais. Esses programas devem ser direcionados para prevenção e controle da enfermidade, sendo alguns dos objetivos buscados: minimizar a exposição ao patógeno, estimular a imunidade dos animais e reduzir os fatores de risco para disseminação da doença (EDWARDS, 2010).

A prevenção das doenças respiratórias bovinas deve-se basear em medidas de higiene, controle no trânsito de animais, quarentena e vacinação contra os principais patógenos que causam o CRB, a implantação de manejos que evitem a superlotação, mudanças bruscas de temperatura e adequado fornecimento de colostro podem auxiliar na prevenção e redução da enfermidade (FLORES, 2007). A instauração da profilaxia vacinal e o uso da metafilaxia também são manejos importantes para redução da incidência do CRB em bovinos (SAÑUDO et al., 2008, TEIXEIRA et al., 2017).

A metafilaxia pode ser definida como a administração em massa de um antibiótico, num momento estratégico, buscando reduzir a manifestação clínica da doença (RADOSTITS et al., 2002). A administração desses fármacos pode ocorrer após exposição ao patógeno, durante a incubação da doença ou no aparecimento dos sinais clínicos iniciais da enfermidade (SMITH, 2009). Avaliando-se a eficácia da administração de antimicrobianos antes do embarque ou na chegada ao confinamento, foi sugerido que o momento mais favorável para realizar a metafilaxia seria após a chegada dos animais aos locais de destino (NICKELL e WHITE, 2010; EDWARDS, 2010).

No entanto as indústrias de alimentos para animais passam por pressão constante para reduzir o uso antimicrobianos devido à preocupação com resíduos desses agentes nos produtos de origem animal, além da resistência a antibióticos, tendo-se que em alguns momentos repensar sobre o uso da metafilaxia (TAYLOR et al., 2010; WINDEYER et al., 2017).

Já as vacinas são indicadas para profilaxia (STOKKA, 2010), sendo indicada sua aplicação antes dos períodos de desafio para os animais (EDWARDS, 2010, LORENZ et al., 2011). Recomenda-se para bezerros de aptidão leiteira, a vacinação no pré-desmame e em bovinos de corte, a vacinação antes do transporte (EDWARDS, 2010; TAYLOR et al., 2010). Ainda Makoschey et al. (2012) relataram que outra forma de prevenir o CRB em bezerros, seria realizar a vacinação das matrizes antes do parto para aumentar a disponibilidade de anticorpos específicos no colostro.

Mesmo com o emprego de vacinas ou de antibióticos, ainda se tem dificuldades para controlar o CRB, sendo fundamental avaliar se os métodos de manejo empregados estão sendo efetivos na prevenção e controle dessa enfermidade (SLOMPO et al., 2017).

2.7.Vacinas comerciais

Os protocolos vacinais são fundamentais para controlar as enfermidades respiratórias como o CRB. Comercialmente estão disponíveis vacinas vivas modificadas e vacinas inativadas com antígenos virais como o BoHV-1, BVDV, bPVI3, e BRSV, associados ou não a antigenos bacterianos como *M. haemolytica, P. multocida e H. somni* (WEST et al., 1999). A maioria desses produtos são indicados para administração SC ou intramuscular e atualmente há muitos estudos sobre sua aplicação via intranasal (FULTON et al., 2003; EDWARDS, 2010; ELLIS et al., 2007; XUE et al., 2010; SOCHA et al., 2013; GOMES, 2016; OLLIVETT et al., 2017).

Em sua maioria, as pesquisas sobre as vacinas visam avaliar a redução da doença clínica e a eliminação de patógenos em testes de desafio, sendo sugerido que se realizem mais observações de campo para fornecer evidências concretas de sua eficácia (WEST et al., 1999). A avaliação da eficiência vacinal e a interpretação dos resultados é muitas vezes uma tarefa difícil, devido ao CRB apresentar diferentes patógenos e fatores estressores ambientais que contribuem para o aparecimento da doença (LORENZ et al., 2011).

A vacinação é o método mais eficaz e de baixo custo para o controle das doenças infecciosas em animais. Um animal pode ser imunizado contra infecções de duas formas: imunização passiva que pode ser natural (pela placenta ou colostro) ou artificial (administração de soro hiperimune); ou pela imunização ativa (vacinação) (FLORES, 2007).

A imunização passiva se dá pela administração de anticorpos pré-produzidos em um animal saudável, fornecendo uma proteção imediata, porém de curta duração. Na imunização ativa, podem-se utilizar vacinas replicativas nas quais os agentes são atenuados (vivos) ou vacinas não replicativas em que os agentes são inativados (mortos), produzindo uma imunidade de desenvolvimento lento, mas de longa duração (TIZARD, 2014).

As vacinas replicativas também podem ser denominadas vacinas vivas, vacinas atenuadas ou vacinas com vírus vivo modificado. Essas vacinas simulam as infecções virais naturais, no entanto os vírus devem passar por métodos específicos de atenuação como: repetidas inoculações em modelos animais ou cultivos celulares, manipulação genética (deleção de genes que levam a sua patogenicidade) ou manipulação por temperatura para diminuir sua capacidade patogênica (FLORES, 2007; BUDDLE et al., 2011) (Figura 1).

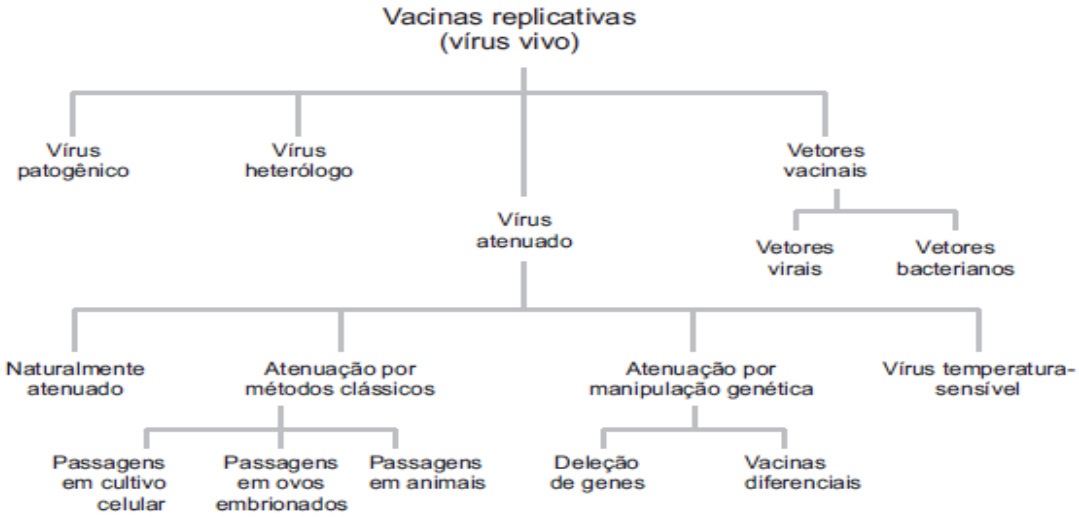


Figura 1. Tipos de vacinas vivas replicativas atenuadas por diferentes métodos. Fonte: FLORES (2007).

Inúmeros tipos de vacina contra vírus são licenciadas para uso veterinário, sendo a maioria composta por vírus inativados ou por vírus vivos atenuados, além da utilização de novas tecnologias, principalmente envolvendo vacinas de DNA e RNA e de subunidades virais (FLORES, 2007).

As vacinas atenuadas possuem algumas vantagens em relação às vacinas inativadas, a principal delas é o envolvimento de todos os componentes do sistema imune, ocorrendo estimulação da resposta imunológica inata e adaptativa. A imunidade desenvolvida é prolongada e reduz ou até exclui a necessidade de realizar reforços vacinais, além de apresentarem um menor custo de produção (SCHATZMAYR, 2003; FLORES, 2007).

Uma desvantagem das vacinas vivas é a chance de ocorrer efeitos adversos que se manifestam pela alta multiplicação no hospedeiro, seja por fatores relacionados ao animal, ou pela reversão da virulência, processo esse em que os microrganismos vacinais podem desenvolver a enfermidade. Além disso, podem também causar inflamação local e necessitam de armazenamento refrigerado (BABIUK et al., 2003; SCHATZMAYR, 2003; MEEUSEN et al., 2007; GASPAR e SANTOS, 2014).

As vacinas termo sensíveis (TS), são atenuadas por um processamento térmico, e os micro-organismos são obtidos pela seleção de variantes que possuem capacidade limitada de replicar sob temperatura corporal (37°C), mas replicam-se eficientemente sob temperaturas mais baixas (30-33°C). O processo resulta do cultivo viral em células sob temperaturas mais baixas que a do organismo hospedeiro, deixando esses agentes sem a capacidade de replicar–se à temperatura corporal, não causando infecção sistêmica quando administradas ao hospedeiro (FLORES, 2007).

Esse tipo de vacina é bastante empregado em viroses respiratórias, como a influenza humana e na infecção pelo BoHV-1 em bovinos. As vacinas TS são geralmente administradas pela via intranasal. Os produtos contra BoHV-1 já são empregadas em vários países, inclusive no Brasil. Uma das principais vantagens das vacinas TS contra o BoHV-1 é a segurança, pelo fato do vírus vacinal acometer somente as células do local inoculado, não sendo capaz de replicar-se à temperatura corporal, sendo então o BoHV-1 TS, em teoria, inapto a acometer o feto, cuja infecção pode levar a aborto (FLORES, 2007).

No Brasil algumas vacinas vivas atenuadas disponíveis comercialmente são: para brucelose, linfadenite caseosa, carbúnculo e tristeza parasitária bovina (GASPAR e SANTOS, 2014).

Vacinas não replicativas ou inativadas possuem os microrganismos inteiros inativados por métodos físicos ou químicos, que provocam a desnaturação das proteases ou danos aos ácidos nucleicos, assim os agentes perdem sua capacidade de provocar a infecção. No entanto eles mantêm sua imunogenicidade, sendo capazes de estimular o sistema imunológico (FLORES, 2007; GASPAR e SANTOS, 2014). As vacinas inativadas são consideradas mais seguras em relação às atenuadas, por não causarem a reversão de virulência, porém não podem fornecer proteção eficaz a longo prazo devido à destruição da capacidade replicativa do patógeno (CHO et al., 2002; GASPAR e SANTOS, 2014).

A resposta imune humoral é a principal via de resposta imune estimulada por vacinas inativadas, sendo pequeno o estímulo da resposta imune celular mediada por linfócitos T citotóxicos (Tc). Após a administração de uma vacina inativada, ocorre estimulo para replicação de clones específicos de linfócitos B, sendo que uma parte desses transforma-se em plasmócitos secretores de anticorpos e parte se modificam em células de memória, de longa duração. Os linfócitos T helper (Th) também são estimulados, auxiliando na proliferação e diferenciação dos linfócitos B. Ainda que desenvolvam uma boa resposta imune a sua magnitude e a duração são relativamente menores do que quando comparadas à resposta imune estimulada pelas vacinas atenuadas (FLORES, 2007).

As vantagens dessas vacinas em relação às vacinas atenuadas são: serem mais seguras em relação ao risco de reversão de virulência e mais estáveis à temperatura ambiente podendo ser armazenadas por longo tempo. No entanto geralmente não estimulam o sistema imunológico tão eficazmente quanto as vacinas vivas, necessitam de aplicação de doses de reforço durante a primo-vacinação e revacinações semestrais ou anuais. As vacinas inativadas

ainda necessitam do emprego de adjuvantes na sua formulação, aumentando seu custo de produção, além de possíveis efeitos colaterais como reação granulomatosa local (FLORES, 2007).

Atualmente a maioria das vacinas licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), usados na bovinocultura são inativadas, sendo elas contra febre aftosa, raiva, IBR, diarreia viral bovina (BVD), leptospirose, clostridioses entre outras (GASPAR e SANTOS, 2014).

No mercado brasileiro estão registrados no MAPA 19 produtos contento BoHV-1 e BVDV e demais agentes que causam o CRB, essas vacinas contêm diferentes combinações de antígenos e cepas virais e/ou bacterianas Em geral os produtos são indicados para aplicação intramuscular ou subcutânea e apenas uma vacina (Inforce 3®, Zoetis, Brasil) atualmente disponivel para aplicação intranasal está registrada a nível nacional. Em relação aos agentes presentes, a maioria das vacinas contêm vírus (mortos) inativados de BVDV, BoHV-1, BRSV e bPIV-3, e apenas quatro apresentam vírus (vivos) atenuados de BoHV-1, BRSV e bPIV-3 (SINDAN, 2018).

Utilizando vacinas contendo vírus vivo modificado (VVM) para BVDV 1 e BoHV-1 Fulton et al. (2003) observaram que três vacinas que continham cepas VVM de BVDV1 induziram uma viremia transitória em alguns animais. Essa viremia durou de 3-7 dias após a vacinação, apresentando maior pico no dia 7. Também relataram que a vacina que continha VVM e inativado de BHoV-1 induziu anticorpos séricos de BoHV-1 mais rapidamente em relação à vacina com apenas cepas VVM BoHV-1. Além disso, o uso de duas doses da vacina com VVM BoHV-1 (dias 0 e 28) em alguns casos induziu níveis maiores de anticorpos séricos e com duração maior, em comparação ao uso de apenas uma dose desse tipo de vacina.

Uma pesquisa recente avaliou a imunogenicidade de oito vacinas para os herpesvírus bovino 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) e vírus da diarreia viral bovina 1 e 2 (BVDV-1, BVDV-2), disponíveis no mercado brasileiro, sendo que seis eram compostas exclusivamente por cepas virais inativadas e duas eram mistas com amostras virais atenuadas termossensíveis e VVM. Anziliero et al. (2015) relataram que a imunogenicidade do BoHV-1 da maioria das vacinas comerciais é aceitável, conferindo uma resposta imune adequada para os animais. A capacidade de gerar resposta imune do BVDV-1 não foi detectada em quatro vacinas e, em seis vacinas contra o BVDV-2. Ficando evidente que as estratégias de formulação e/ou

produção de vacinas para rebanhos bovinos brasileiros, principalmente com relação ao BVDV, devem ser urgentemente revistas.

Esses dados corroboram com Silva et al. (2007) que testaram seis vacinas com vírus atenuados de BoHV-1, e apenas duas destas induziram títulos de proteção aceitáveis contra o BoHV-1 e o BoHV-5. A razão da baixa imunogenicidade em vacinas pode ser multifatorial, podendo estar relacionada com a concentração antigênica vacinal, os métodos de inativação, formulação e a concentração de adjuvantes. Todos esses fatores devem ser avaliados e ajustados na tentativa de melhorar a estimulação da resposta imune.

2.8. Imunologia

2.8.1. Resposta imune geral

O sistema imune tem a função de proteger o organismo contra invasões de microrganismos patogênicos, sendo essencial para a vida. Ele é constituído por tecidos, células e mediadores químicos especializados, cuja eficiência depende da capacidade do reconhecimento de antígenos endógenos e exógenos ao hospedeiro (NOSSAL, 1993; TIZARD, 2014).

Diversos mecanismos estão interligados para assegurar à eficácia do sistema imune, dentre eles as barreiras físicas como a pele, que evitam a penetração de microrganismos invasores, a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (TIZARD, 2014).

A resposta imune inata é imediatamente estimulada quando um patógeno penetra as barreiras físicas, atuando na sua rápida eliminação e tendo uma ação que dura poucas horas (TIZARD, 2014). Este tipo de resposta é considerada inespecífica, sendo realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos, que identificam o micro-organismo, realizam a fagocitose e desencadeiam a liberação de citocinas que colaboram para a instalação do processo inflamatório e exacerbação da resposta imune (ABBAS et al., 2008). Já a resposta imune adaptativa possui especificidade na identificação dos antígenos, gerando memória imunológica, podendo assim desencadear uma resposta imune mais rápida e eficaz frente a exposições posteriores ao mesmo agente (ABBAS et al., 2008; TIZARD, 2014).

A resposta imune adaptativa ou especifica pode ser ainda dividida didaticamente em: resposta imune celular na qual atuam principalmente os linfócitos T auxiliares $CD4^+$ (T helper

ou Th) e linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ (Tc) e resposta imune humoral, sendo mediada por anticorpos produzidos por plasmócitos, os quais são células derivadas dos linfócitos B. A divisão entre os mecanismos da resposta imune não é absoluta, já que todo o sistema imune está interligado, para realizar o combate aos agentes patogênicos (FLORES, 2007).

Na resposta imune celular os linfócitos auxiliares Th $CD4^+$ são responsáveis pela ativação dos linfócitos B, macrófagos e também dos linfócitos citotóxicos Tc $CD8^+$. Já os linfócitos Tc $CD8^+$ ou efetores, realizam o reconhecimento de antígenos intracitoplasmáticos, desempenhando um papel fundamental nas respostas antivirais mediando a destruição das células infectadas (FLORES, 2007; JUNIOR et al., 2010).

Existem três principais subpopulações de linfócitos auxiliares Th $CD4^+$: 1) os linfócitos Th1 são estimulados pela interleucina 12 (IL-12) e, em resposta, secretam IL-2 e interferon-γ (IFN-γ), estimulando as respostas imunes celulares, como a hipersensibilidade do tipo tardia e a ativação de macrófagos; 2) os linfócitos Th 2 que secretam IL-4, IL-13 e IL-10, as quais estimulam a proliferação de linfócitos B e a secreção de imunoglobulinas, promovendo respostas imunológicas mediadas por anticorpos; 3) e os linfócitos Th17 que possuem a função de secretar IL-17, a qual recruta granulócitos e macrófagos, quando organismo é invadido por um patógeno (FLORES, 2007).

Os linfócitos citotóxicos Tc $CD8^+$ se aderem às células alvo, proliferam e eliminam por citotoxicidade qualquer célula que contenha esse antígeno especifico, induzindo a apoptose da célula alvo pela ação de perforinas, granzimas e pela expressão do receptor FasL (CD95) (PARKIN e COHEN, 2001).

Na resposta imune adaptativa humoral atuam os linfócitos B que são as células que se destacam pela capacidade de diferenciar-se em plasmócitos, os quais são responsáveis por produzir as imunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgE e IgD (FLORES, 2007).

As imunoglobulinas também denominadas de anticorpos ligam-se aos micro-organismos e os impedem de infectar as células, prevenindo que uma infecção se estabeleça mesmo com a presença dos patógenos no organismo (ABBAS et al., 2008).

A imunoglobulina IgG é mais predominante no soro e a principal responsável pela defesa sistêmica. A IgG liga-se a antígenos específicos, presentes na superfície do patógeno, e tem capacidade de recobrir os microrganismos, tornando-os alvo para a fagocitose por neutrófilos e macrófagos (FLORES, 2007; ABBAS et al., 2008).

A IgM participa dos processos de opsonização e neutralização viral. Quando em contato com antígenos após infecção natural ou vacinação, ocorrem as respostas imunes, primária e secundária, e em ambas ocorre a produção de isótipos IgM e IgG, porém, na resposta primária a IgM é a principal imunoglobulina presente. Já na resposta secundária, a imunoglobulina predominante é a IgG. A concentração de IgM reduz rapidamente nas duas respostas, sendo que, após uma ou duas semanas, observa-se queda acentuada de IgM enquanto a produção de IgG é permanente (FLORES, 2007; ABBAS et al., 2008).

A imunoglobulina produzida em mucosas é a IgA, sendo a responsável pela proteção dos sistemas gastrointestinal, respiratório e urogenital, estando presente também na saliva, lágrimas e leite. Esta imunoglobulina promove o aprisionamento de antígenos ou microrganismos no muco, impedindo o contato direto de patógenos com a superfície da mucosa (FLORES, 2007; ABBAS et al., 2008).

A IgE atua na imunidade contra parasitas e em resposta a alergias, esta imunoglobulina pode ser encontrada em pequenas quantidades no soro. Em relação à IgD, ela é uma imunoglobulina comumente encontrada na superfície de linfócitos imaturos. Sua função ainda não é bem elucidada, sendo raramente encontrada nos fluidos corporais (FLORES, 2007; JUNIOR et al., 2010).

2.8.2. Resposta imune do trato respiratório

Diversos dos microrganismos bacterianos envolvidos no CRB são comensais do trato respiratório superior (EDWARDS, 2010). Bactérias como *M. haemolytica*, *P. multocida*, *M. bovis*, *H. somni*, *Streptomyces* sp., *Neisseria* spp. e *Bacillus* spp foram isoladas em swabs nasofaríngeos e em lavado broncoalveolar de bovinos saudáveis (ALLEN et al..,1991, ANGEN et al.,2009). Normalmente esses agentes causam infecções secundárias após a instalação dos agentes virais que estão envolvidos na etiologia do CRB (ACKERMAN et al., 2010; EDWARDS, 2010; LORENZ et al., 2011).

A interação entre hospedeiro e patógeno é um processo complexo que desencadeia inúmeros desafios para o sistema respiratório. A resposta imune inata e adquirida são os mecanismos que irão prevenir a aderência e migração dos patógenos no trato respiratório comensais do trato respiratório anterior ao trato posterior (CALLAN e GARRY, 2002).

Possivelmente estes agentes resultam em altos índices de complexo respiratório dos bovinos devidos a particularidades físicas e anatômicas do pulmão da espécie. A árvore traqueobrônquica bastante longa eleva o volume de espaço morto em relação a outras espécies, o que confere uma maior área superficial para a deposição de partículas e torna mais lento o fluxo de vapores, gases e partículas (ACKERMAN et al., 2010). Além disso, os pulmões de ruminantes possuem poucos poros de Kohn entre as unidades alveolares, o que diminui a ventilação colateral, limitando a quantidade de ar que pode se deslocar dos alvéolos com ventilação adequada para aqueles que estejam parcialmente obstruídos por exsudato ou fluido de edema, o que limitam a insuflação alveolar e a capacidade de expelir o exsudato dos alvéolos. Desta maneira é imprescindível o bom funcionamento do sistema imunológico inato, um epitélio das vias aéreas intacto e um aparelho mucociliar funcional, para prevenir infecções iniciais do trato respiratório inferior (ACKERMAN e BROGDEN, 2000).

Para manter-se hígido o sistema respiratório possui mecanismos de defesa física como o lençol mucociliar, reflexos protetores de tosse e espirro, microbiota comensal, e a defesa celular na qual atuam os macrófagos alveolares e os neutrófilos (BURTON et al., 2005; ACKERMANN et al., 2010; SANTOS e ALESSI, 2016). Todos esses mecanismos auxiliam a reduzir a colonização por microrganismos patogênicos no trato respiratório (ACKERMANN et al., 2010).

O lençol mucociliar recobre as vias respiratórias, incluindo traqueia, brônquios e os bronquíolos, o muco forma uma camada continua, a qual é direcionada no sentido da laringe por meio do batimento dos cílios presentes no epitélio respiratório. Algumas de suas funções essenciais são a remoção de partículas e a distribuição de substâncias protetoras, além de também contribuir para que ocorra a eliminação de gases hidrossolúveis tóxicos e promover o transporte de anticorpos, como a imunoglobulina IgA (SANTOS e ALESSI, 2016).

Os mecanismos de reflexos, como o espirro e a tosse, auxiliam na eliminação mecânica de partículas ou material estranho ao trato respiratório. O reflexo de tosse é fundamental para a eliminação do excesso de muco ou de exsudatos presentes nas vias respiratórias, prevenindo que esse material chegue ao interior dos alvéolos. Para esse mecanismo ter sua eficiência garantida, é importante que alvéolos sejam repletos de ar e tenham sua elasticidade normal (SANTOS e ALESSI, 2016).

O macrófago alveolar é a principal célula do sistema respiratório, sendo a principal defesa celular do pulmão, realizando a fagocitose de partículas e microrganismos exógenos,

apresentação de antígenos para demais células e secreção de citocinas inflamatórias (LOHMANN-MATTHES et al., 1994; ACKERMANN et al., 2010; TIZARD, 2014). Essas células além de realizarem funções essenciais no trato respiratório, estão também em maior proporção, sendo aproximadamente 68% de macrófagos, 11% de neutrófilos, 2% de linfócitos, e menos de 1% de eosinófilos em bezerros com idade superior a um mês de vida (GONÇALVES et al., 2004; GRIFFEN et al., 2010). Pringle et al. (1988) relataram a presença de até 88% de macrófagos no trato respiratório inferior de bezerros saudáveis com quatro semanas de vida.

Outra população celular essencial para a defesa do sistema respiratório são os neutrófilos que englobam e destroem microrganismos patogênicos (BURTON et al., 2005; TIZARD, 2014).

Macrófagos e neutrófilos exercem ações fundamentais na imunidade inata e adaptativa, como reconhecimento e destruição de patógenos (HENNEKE e GOLENBOCK, 2004). Macrófagos podem ainda, alterar sua resposta frente à inflamação, passando da ação de eliminação para o processo de reparação. Os macrófagos ativados que eliminam patógenos invasores são denominados macrófagos (M1), e se convertem em macrófagos (M2) quando desenvolvem características anti-inflamatórias (TIZARD, 2014). Os macrófagos M2 podem ser subdivididos em: M2a (ativados por interleucinas (IL), IL-4 ou IL-13), M2b (ativados por complexos imunes combinados a IL-1 β ou lipopolissacarídeo) e M2c (ativados por IL-10, TGF-β ou glicocorticoides). Os macrófagos M1 estimulam o desenvolvimento de uma resposta imune tipo Th1, enquanto os macrófagos M2 estimulam uma resposta imune do tipo Th2 (MARTINEZ et al., 2008).

Os linfócitos envolvidos na resposta imune Th1 estão relacionados a respostas imunes celulares, atuando contra micro-organismos intracelulares, como as micobactérias e os vírus. Os linfócitos presentes na resposta Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Essas citocinas estimulam a proliferação de linfócitos B e a secreção de imunoglobulinas (TIZARD, 2014). As respostas Th2 estão associadas com as doenças alérgicas e infecções por helmintos (PARKIN e COHEN, 2001).

Os macrófagos alveolares em resposta a patógenos microbianos e outros estímulos, secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-8 e TNF-α (STEVENS e CZUPRYNSKI, 1995; MALAZDREWICH et al., 2001). Os efeitos quimiotáticos da IL-8 resultam em um influxo maciço de neutrófilos do sangue para os espaços alveolares do pulmão (LEITE, 2000).

Os neutrófilos fornecem a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, trauma tecidual ou qualquer sinal inflamatório inicial. Desempenham funções relevantes tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa (WEISS e WARDROP, 2010; TIZARD 2014).

Durante infecções pulmonares, os neutrófilos migram da circulação para o espaço intersticial), processo denominado recrutamento leucocitário, seguindo os eventos de rolamento, adesão, e transmigração dos neutrófilos (KENNEDY e DELEO, 2009; KOBAYASHI e DELEO, 2009; TIZARD, 2014).

As selectinas L, E e P medeiam as interações iniciais entre neutrófilos e endotélio, levando à sua ligação e rolamento (WEISS e WARDROP, 2010). A ligação que ocorre entre os neutrófilos e essas moléculas de adesão, desencadeiam no neutrófilo reações que levam a um estado de firme adesão ao endotélio, mediado pela ligação a moléculas das integrinas β2. Após estar firmemente ligado, o neutrófilo rola por entre os poros endoteliais, iniciando sua migração (WEISS e WARDROP, 2010; MAYADAS et al., 2013).

Após chegarem ao local lesionado, os neutrófilos fazem o reconhecimento dos invasores, e iniciam a fagocitose, destruindo os agentes patogênicos por meio de dois processos diferenciados: um ocorre através da ação dos grânulos intracelulares que liberam enzimas líticas como as mieloperoxidase, defensinas, lisozima e lactoferrina. O outro envolve o metabolismo oxidativo, no qual ocorre a produção de EROs (BORREGAARD, 2010; MAYADAS et al., 2013). O metabolismo oxidativo é um processo que ocorre em neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e monócitos, cujo extravasamento para tecidos sadios durante a reação inflamatória podem causar lesões teciduais no hospedeiro (BABIOR, 1978; TIZARD, 2014).

No grupo de EROs estão inclusos o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que dão origem a metabólitos oxidantes, que realizam a eliminação dos patógenos incorporados (VITKO-SARSAT et al., 2000; BURGOS et al., 2011). O mecanismo de metabolismo oxidativo é muito importante, pois serve como indicador da defesa contra infecções bacterianas, podendo ser utilizado para avaliar a funcionalidade e a resposta a agentes patogênicos em diferentes tecidos (KAMPEN et al., 2004). Se a atividade de metabolismo oxidativo estiver reduzida, pode ocorrer à dificuldade na eliminação de agentes microbianos, consequentemente aumentando a susceptibilidade a doenças infecciosas (JOHNSTON, 2001; DU MANOIR et al., 2002; GOMES, 2016).

Os neutrófilos ao contrário dos macrófagos possuem uma vida curta, e não suportam prolongadas e repetidas fagocitoses. A sua produção é comandada pela citocina, denominada fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Os neutrófilos após desempenharem sua função, tornam-se apoptóticos, sendo então, fagocitados por macrófagos, que produzem a IL-23. Essa interleucina estimula a produção de IL-17 pelos linfócitos Th17. A IL-17 estimula a produção de G-CSF e a atividade das células-tronco, estimulando assim a produção de neutrófilos conforme sua taxa de apoptose (TIZARD, 2014).

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 537p.

ACKERMAN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. Innate immunology of Bovine Respiratory Diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.2, p.215-228, 2010.

ACKERMANN, M.R.; BROGDEN, K.A. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. **Microbes and infection**, v. 2, p.1079-1088, 2000.

ADAIR, B.M.; BRADFORD, H.E.L.; MACKIE, D.P.; MCNULTY, M.S. Effect of macrophages and ‘‘in vitro’’ infection with parainfluenza type 3 and respiratory syncytial viruses on the mitogenic responses of bovine leukocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.2, p.225–229, 1991.

ADLER, H.; FRECH, B.; MEIER, P.; JUNGI, T.W.; PETERHANS, E. Noncytopathic strains of bovine viral diarrhea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.202, n.3, p.1562–8, 1994.

ALLEN, J. W, VIEL, L, BATEMAN, K. G.; ROSENDAL, S.; SHEWEN, P. E.; PHYSICK-SHEARD, P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations

between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.55, n. 4, p.341-346, 1991.

ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H .;. EDDY, E, R.G. **Medicina Bovina. Doenças e Criação de Bovinos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, 1080 p.

ANGEN, O.; THOMSE, J.; LARSEN, L. E.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, P, M., ENEMARK, J. M. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar lavage fluid and acute phase protein response. Veterinary Microbiology, v.137, n.1/2, p.165–171, 2009.

BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **New England Journal of Medicine,** v. **298**, n 12. p.659-68, 1978.

BABIUK, L. A.; PONTAROLLO, R.; BABIUK, S.; LOEHR, B.; S. HURK, V.D.L. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. **Vaccine**, v.21, n.7/8, p. 649-658, 2003.

BAIGENT, S. J.; ZHANG, G.; FRAY, M. D.; FLICK-SMITH, H.; GOODBOURN, S.; MCCAULEY, J.W. Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. **Journal of Virology**, v.76, n.2, p.8979–8988, 2002.

BAPTISTA, L. A, REZENDE, A. L.; FONSECA, P. A.; MASSI, R. P.; NOGUEIRA, G. M.; MAGALHÃES, L. Q.; HEADLEY, S. A.; MENEZES, G. L.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E. Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from Southeastern Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p.791-799, 2017.

BASQUEIRA, N. S.; MARTIN, C. C.; COSTA, J, F. R.; LÍRIA HIROMI OKUDA, L. H.; PITUCO, M. E.; BATISTA, C. F.; ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA, A, M. M. P.; GOMES, V. Bovine Respiratory Disease (BRD) Complex as a Signal for Bovine

Viral Diarrhea Virus (BVDV) Presence in the Herd. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45. n.1, p.1-6, 2017.

BATISTA, C. F.; BERTAGNON, H. G.; BELLINAZZI, J. B.; SANTOS, K. R.; DIAS, M. R. B.; GOMES, R. C.; SOUZA, R. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação endoscópica do sistema respiratório de bovinos sadios. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p.36-41, 2016.

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.; BATISTA, C. F.; SANTOS, B.P.; LIMA, M. G. B, BELLINAZZI, J.B.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Influência da orquiectomia na função imune broncoalveolar de garrotes de sete meses de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.2, p.310-316, 2017.

BOOKER, C.W.; ABUTARBUSH, S.M.; MORLEY, P.S.; JIM, G.K.; PITTMAN, T.J.; SCHUNICHT, O.C.; PERRETT, T.; WILDMAN, B.K.; FENTON, R.K.; GUICHON, P.T. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. **Canadian Veterinary Journal**. v.49, n.5, p.473-481, 2008.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

BRASIL, N.D. A.; HINNAH, F.L.; FISS,L .; SALLIS, E. S. V.; GRECCO, F. B.; LADEIRA, S. R. L.; PEREIRA, C. M.; SCHILD, A.L. Doenças respiratórias em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 33 surtos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.6, p.745-751, 2013.

BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO,A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L. B.; LINHARES, D.

C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n.1, p. 7-19, 2010.

BRYSON, D.G. Calf pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Large Animal Practice**, v., n.2, p.237-257, 1985.

BRYSON, D.G.; MCNULTY, M.S.; MCCRACKEN, R.M.; CUSH, P.F. Ultrastructural features of experimental parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. Journal of Comparative Pathology, v. 93, n3., p.397–414, 1983.

BUDDLE, B. M.; WEDLOCK, D. N.; DENIS, M.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. **Veterinary Microbiology,** v.151, n. 1/2, p.14-22, 2011.

BURGOS, R. A.; CONEJEROS, I.; HIDALGO, M. A.; WERLING, D.; HERMOSILLA, C. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 1-2, p. 1/10, 2011.

BURTON, J. L.; MADSEN, S. A.; CHANG, L.C.; WEBER, P. S. D.; BUCKHAM, K. R.; VAN DORP, R.; HICKEY, M.-C.; EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, n. 3/4, p.197–219, 2005.

BURTON, J.L. Supplemental chromium : its benefits to the bovine immune system. **Animal Feed Science and Technology**, v.53, n.2, p.117-131, 1995.

CALLAN, R. J.; GARRY, F. B. Biosecurity and bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.18, n.1, p.57–77, 2002.

CHANG, X.; MOWAT, D.N. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal Animal Science**, v. 70, n.2, p.559-565, 1992.

CHASE, C.C.L.; THAKUR, N.; DARWEESH, M.F.; MORARIE-KANE, S.E.; RAJPUT, M.K. Immune response to bovine viral diarrhea virus - looking at newly defined targets. **Animal Health Research Reviews**, v.1, n.11, p.4-14, 2015.

CHO, H. W.; Howard, C. R.; Lee, H.W. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. **Intervirology**, v.45, n.4/6, p.328-333, 2002.

CONFER, A.W. Update on bacterial pathogenesis in BRD. **Animal Health Research Reviews**, v.10, n.2, p.145-148, 2009.

COOPER, V. L.; BRODERSEN, B. W. respiratory disease diagnostics of cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n2**,** p.409-416, 2010.

CUSACK, P.M.V.; MCMENIMAN, N.; LEAN, I.J. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n.8, p.480–7, 2003.

DOU, Y.; FU, B.; SUN, R.; LI, W.; HU, W.; TIAN, Z, WEI .;H. Influenza Vaccine Induces Intracellular Immune Memory of Human NK Cells. **Plos One,** v.10, n.3, p.1-17, 2015.

DU MANOIR, J.M.; ALBRIGHT, B. N.; STEVENSON, G.; THOMPSON, S.H.; MITCHELL, G. B.; CLARK, M. E, CASWELL, J. L. Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, n.3/4, p.175–186, 2002.

DYER, R.M,; MAJUMDAR, S.; DOUGLAS, S. D.; KORCHAK, H. M . Bovine parainfluenza-3 virus selectively depletes a calciumdependent, phospholipid-dependent protein kinase C and inhibits superoxide anion generation in bovine alveolar macrophages. **The Journal of Immunology**, v.153, n.3, p.1171–1179, 1994.

EDWARS, T.A. Control Methods for Bovine Respiratory Disease for Feedlot Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.2, p.273-273, 2010.

ELLIS, J.; GOW, S.; WEST, K.; WALDNER, C.; RHODES, C.; MUTWIRI, G.; ROSENBERG, H. Response of calves to challenge exposure with virulent bovine respiratory syncytial vírus following intranasal administration of vacines formulated for parenteral administration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.230, n.2, p 233-243, 2007.

FILION, L. G.; WILLSON, P. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H, BABIUK, L.A.; THOMSON, R. G. The possible role of stress in the induction of pneumonic pasteurellosis. **Canadian Jounal of Comparative Medicine**, v.48, n.3, p.268–274, 1984.

FINO, T. C. M.; MELO C. B.; RAMOS, A. F.; LEITE, R. C. Diarréia Bovina A Vírus (Bvd) - Uma Breve Revisão**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.34, n.2, p.131-140, 2012.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria. UFMS, 2007. 888.p.

FRASER, C.M. 1996. **Manual Merck de Veterinária:** um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7. ed. Roca, São Paulo. p.565.

FULTON R.W., BLOOD K.S., PANCIERA R.J., PAYTON M.E., RIDPATH J.F., CONFER A.W., SALIKI J.T., BURGE L.T., WELSH R.D., JOHNSON B.J. & RECK A. Lung pathology and infectious agents in fatal feddlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, n.4, p.464-477, 2009.

FULTON, R. W.; SALIKI, J. T,; BURGE , L. J.; PAYTON, M. E. Humoral Immune Response and Assessment of Vaccine Virus Shedding in Calves Receiving Modified Live Virus Vaccines Containing Bovine Herpesvirus-1 and Bovine Viral Diarrhoea Virus 1a. **Journal of veterinary medicine**, v.50, n.1, p.31-17, 2003.

GASPAR, E. B.; SANTOS, L. R. **Vacinação de Bovinos: Esclarecendo Algumas Dúvidas. – Dados eletrônicos. – Bagé: Embrapa Pecuária Sul,** 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1003986>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GERSHWIN, L. J.; SCHELEGLE, E.S.; GUNTHER, R. A.; ANDERSON, M. L.; WOOLUMS, A .R .; LAROCHELLE, D. R .; BOYLE,G.A.; FRIEBERTSHAUSER, K. E.; SINGER, R. S. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. **Vaccine**, v. 16, n 11/12, p. 1225-1236, 1998.

GIL, L. H.; ANSARI, I. H.; VASSILEV, V.; LIANG, D.; LAI, V. C.; ZHONG, W.; HONG, Z.; DUBOVI, E. J.; DONIS, R. O. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. **Journal of Virology**, v.80, n.6, p.900–911, 2006.

GOMES, C.G.; BERTAGNON, H.G.; BATISTA, C.F.; SANTOS, K.R.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Caracterização Leucocítica Pulmonar de Bezerros Após Vacinação Intranasal. **Revista O Biológico**, v.77, n.2, p.235-236, 2015.

GOMES, R. C. **Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2016.

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 RespiratoryDisease in Dairy Calves and Cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.2, p.43-59, 2010.

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, n.2, p.381-394, 2010.

GUZMAN, E.; TAYLOR, G. Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves. **Molecular Immunology**. v.66, n.1, p.48–56, 2015.

HENDERSON, G.; ZHANG, Y.; JONES, C. The bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. **Journal of General Virology**, v.86, n.10, p.2697–2702, 2005.

HENNEKE, P.; GOLENBOCK, D.T. Phagocytosis, innate immunity and host-pathogen specificity. **Journal of Experimental Medicine**. v.199, n.1, p.1–4, 2004.

HENRICKS, P. A.; BINKHORST, G.J.; NIJKAMP, F.P. Stress diminishes infiltration and oxygen metabolism of phagocytic cells in claves. **Inflammation**, v.11, n.4, p.427–437, 1987.

HODGSON, P.D.; AICH, A.; MANUJA, A.; HOKAMP, H.; ROCHE, F.M.; BRINKMAN, F.S.L.; POTTER, A.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P.J. Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. **Comparative and Functional Genomics**, v.6, n., p.244–250, 2005.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine Supplement,** v. 11, n.4, p 45-53. 2005.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PECUÁRIA DE CORTE**. 2015. Disponívelem:<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/bovinocultura_de_corte_2017.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2018.

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, n1/2, p.67-74, 2005.

JOHNSTON, R. B. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. **Current Opinion in Hematology**, v.8, n.1, p.17–22. 2001.

JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.5, p.552-80, 2010.

KAMPEN, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live Staphylococcus aureus. **Journal of Immunological Methods**, v.289, n.1/2, p.47–55, 2004.

KAPIL, S.; BASARABA, R.J. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza- 3, and respiratory coronavirus, **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice,** v.13, n.3, p.455-469, 1997.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v.1, n. 3, p. 309-333, 2009.

LEITE, F.; BROWN, J. F.; SYLTE, M.J.; BRIGGS, R.E.; CZUPRYNSKI, C. J. Recombinant bovine interleukin-1beta amplifies the effects of partially purified Pasteurella haemolytica leukotoxin on bovine neutrophils in a beta (2)-integrin-dependent manner. **Infection and Immunity**, v.68, n.10, p.5581–5586, 2002.

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, n. 9, p. 1678–1689. 1994.

LONERAGAN, G.H.; DARGATZ, D.A.; MORLEY, P.S.; SMITH, M.A.Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots. **Jounal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, n.8, p.1122-1127, 2001.

LORENZ, I.; EARLEY, B.; GILMORE, J.; HOGAN, I.; KENNEDY, E.; MORE, S.J. Calf health from birth to weaning. III. Housing and management of calf pneumonia. **Irish Veterinary Journa**l, v.64, n.1, p.1-9, 2011.

MAGSTADT, D. R.; SCHULER, A. M.; COETZEE, J. F.; KRULL, A. C.; O'CONNOR, A. M.; COOPER, V. L.; ENGELKEN, T. J. Treatment history and antimicrobial susceptibility results for Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, and Histophilus somni isolates from bovine respiratory disease cases submitted to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory from 2013 to 2015**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.30, n.1, p. 99-104, 2018.

MAKOSCHEY, B.; RAMAGE, C.; REDDICK, D.; FRASER, S.; DONACHIE, W. Colostrum from cattle immunized with a vaccine based on iron regulated proteins of *Mannheimia haemolytica* confers partial protection. **Vaccine**, v.20, n.5, p.969-973, 2012.

MALAZDREWICH, C.; AMES, T. R.; ABRAHAMSEN, M. S.; MAHESWARAN, S. K. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 3, p. 297–310, 2001.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v.13, n. p.453–461, 2008.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p.181-218, 2013.

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

MENDES, M. B.; BITTAR, J. F. F.; PEREIRA, W. B. A.; ARDUINO,G. G. C.; BITTAR, E. R. PANETTO, C.; SANTOS, J. P. Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1, Anais... VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. 2009.

MOSIER, D. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. **Animal Health Research Reviews**, v.15, n.2, p.166–168, 2014.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v.38, n.2, p.181–209, 2007.

NEUTRA, M. R, KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge**. Nature Reviews Immunology**, v. 6, n.2, p.148–158. 2006.

NICKELL, J. S.; WHITE, B. J. Metaphylactic Antimicrobial Therapy for Bovine Respiratory Disease in stocker and feedlot Cattle, **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n.2, p.285-301, 2010.

NOSSAL, G. J. Life, death and immune system. **Science Animal**, v. 269, n. 3, p.52-62,1993.

OLLIVET, T.L.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F.; NYDAM, D.V.; HEWSON, J.;

CASWELL, J.; DUNN, P.; KELTON, D.F. Field trial to evaluate the effect of an intranasal respiratory vaccine protocol on calf health, ultrasonographic lung consolidation, and growth in Holstein dairy calves. **Jounal Dairy Science**, v. 101, p.1–10. 2017.

OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v.46, n.1, p.87-92, 2014.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v.357, p.1777-1789, 2001.

PATRICK, R. L. A dairy producer's view of respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**. v.10, n.2 p. 111-112, 2009.

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 histological variables. **Canadian Journal of Veterinary Research**,v.52,n.2, p.239-248.1988.

QUINCOZES, C.G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.** 2007. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C. HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737.p.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2ºed. São Paulo: Varela, 2001. 426.p.

ROSENBERG, H.F.; DOMACHOWSKE, J.B. Inflammatory responses to respiratory syncytial virus (RSV) infection and the development of immunomodulatory pharmacotherapeutics. **Current Medicinal Chemistry**. v.19, n.10, 1424–1431, 2012.

ROTH, J. A. Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. **Procedia in Vaccinology**, v.5, p.127-136, 2011.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 856.p.

SAÑUDO, C.; JIMENO, V.; CERVIÑO, M. "Diseño de alojamientos para el ganado vacuno en cebo" "Patología del ternero de cebo" Producción de ganado vacuno de carne y tipos comerciales en España. **Schering-Plough**, v.89, n.103, p.147-155, 2008.

SCHATZMAYR, H. G.Novas perspectivas em vacinas virais. **História, Ciências, Saúde. Manguinhos**, vol. 10, n.2, p.655-69, 2003.

SILVA, L.F.; WEIBLEN, R., FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1471-1474, 2007.

SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Compêndio de produtos veterinários**. Disponível em:<http://www.cpvs.com.br/cpvs/default.aspx>. Acesso em: 04 jun. 2018.

SLOMPO, D.; BERTAGNON, H. G.; HORST, E . H.; NEUMANN, M.; MAREZE, J.; SOUZA, A. M.; JÚNIOR, E. S. S.; GOLDONI, I.; ASKEL, E. J. Manejo do complexo respiratório bovino em confinamento: Revisão. **PUBVET**, v.11, n.4, p.381-392, 2017.

SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 4. ed: Mosby Elsevier, 2009. 187.p.

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 of Animal Science**, v.84, n.8, p.1999-2008, 2006.

SOCHA, W.; ROLA, J.; BEDNAREK, D.; URBAN-CHMIEL, R.; ŻMUDZIŃSKI, J.F. Shedding course of bovine respiratory syncytial vírus and bovine parainfluenza 3 virus in calves vaccinated intranasally. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.57, n.4, p.479-483, 2013.

SPONCHIADO, D. **Prevalência dos principais vírus respiratórios em bovinos da raça holandesa, no estado do Paraná**. 2014. 151p. Tese (Doutorado)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

SRIKUMARAN, S.; KELLING, C. L.; AMBAGALA, A. Immune evasion by pathogens of bovinerespiratory disease complex. **Animal Health Research Reviews**. v.8, n.2, 215-229, 2007.

STEVENS, P. CZUPRYNSKI, C. J. Dissociation of cytolysis and monokine release by bovine mononuclear phagocytes incubated with Pasteurella haemolytica partially purified leukotoxin and lipopolysaccharide. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n.2, p.110/117, 1995.

STOKKA, G. L. Prevention of respiratory disease in cow/calf operations. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n.2, p.229-241, 2010.

SUDARYATMA, P. E.; NAKAMURA, K.; MEKATA, H.; SEKIGUCHI, S.; KUBO, M.; KOBAYASHI, I.; SUBANGKIT, M.; GOTO, Y.; OKABAYASHI, T. Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection Enhances Pasteurella multocida Adherence on Respiratory Epithelial Cells, **Veterinary Microbiology**, v.220, p.1-22. 2018.

SVENSSON, C.; LIBERG, P. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. **Preventive Veterinary Medicine**, v.73, n.1 p.43-53, 2006.

TAYLOR, J.D.; FULTON, R.W.; LEHENBAUER, T.W.; STEP, D.L.; CONFER, A.W. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures?. **Canadian Veterinary Journal**, v.51, n.12, p.1351–1359, 2010.

TEIXEIRA, A.G.V.; MCART, J.A.A.; BICALHO, R.C. Efficacy of tildipirosin metaphylaxis for the prevention of respiratory disease, otitis and mortality in pre-weaned Holstein calves. **The Veterinary Journal**, v.219, p.44-48. 2017.

TIMSIT, E .; HALLEWELL, J .; BOOKER, C .; TISON, N.; AMAT, S.; ALEXANDER, T.W . Prevalence and antimicrobial susceptibility of Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, and Histophilus somni isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v.208, p.118-125, 2017.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 568.p.

VIANA, L.; GONÇALVES, R. C.; FILHO, J. P. O.; PAES, A. C.; CHIACCHIO, S. B.; RIBEIRO, M. G. Susceptibilidade in vitro a antimicrobianos da Mannheimia haemolytica e da Pasteurella multocida isoladas de ovinos sadios e com doenças respiratórias. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p.111-114, 2007.

VITKO-SARSAT, R. W.; RIEU, DESCAMPS-LATSCHA, R, P, B.; LESAVRE, P, HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. **Biology of Disease**, v. 80, n.5, p.617-653, 2000.

VIUFF, B.; UTTENTHAL, A.; TEGTMEIER, C.; ALEXANDERSEN, S. Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization. **Veterinary Pathology**, v.33, n4., p.383–390, 1996

WATTS, J.L.; SWEENEY, M.T. Antimicrobial resistance in bovine respiratory disease pathogens: measures, trends, and impact on efficacy. **Veterinary Clinics of the North America: Food Animal Practice**, v. 26, n.1, p.79–88, 2010.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6th, Ames, Iowa : Wiley-Blackwell, 2010, 1206. p.

WEST, K.; PETRIE, L.; KONOBY, C.; HAINES, D.M.; CORTESE, V.; ELLIS, J.Á. The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. **Vaccine,** v.18, n.9/10, p.907-919. 1999.

WINDEYER, C.; TIMSIT, E.; BARKEMA, H. Bovine respiratory disease in preweaned dairy calves: Are current preventative strategies good enough?. **The Veterinary Journal**, v.224, p.1-6, 2010.

XUE, W.; ELLIS, J.; MATTICK, D.; SMITH, L.; BRADYA, R.; TRIGO, E. Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, P bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. **Vaccine**, v. 28, n.22, p.3784-3792, 2010.

4. ARTIGO

Influência de vacinas comerciais intranasal e intramuscular contra viroses respiratórias bovinas na região broncoalveolar de bezerras sadias[1]

Patricia S. Rossi[2*], Rafael I. Mattei[3], Natali R. Schllemer[3], Gabriela R. Thomaz[3], Anna V. Antunes[3], Mauricio P. Virmond[4], Heloisa G. Bertagnon[5]

ABSTRACT. Rossi P.S., Mattei R.I., Schllemer N.R., Thomaz G.R., Antunes A.V, Virmond M.P & Bertagnon H.G.2018. **[Influence of intranasal and intramuscular commercial vaccines against bovine respiratory viruses in the bronchoalveolar region of healthy calves.]** Influência de vacinas comerciais intranasal e intramuscular contra viroses respiratórias bovinas na região broncoalveolar de bezerras sadias. *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00.* Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro Oeste, Rua Simeão Varela de Sá, 03, Vila Carli, Guarapuava-PR, 85040-080, Brasil, E-mail: patisrossi@gmail.com

The objective of this study was to compare the effects of two commercial vaccines against bovine respiratory viruses, one intranasal and the other intramuscular, on the cytological profile, cellular oxidative metabolism and IgA immunoglobulin production in the bronchoalveolar region of healthy calves. Twenty-one healthy Jersey heifers, aged 18 ± 2 months and 200 kg (± 50 kg), were distributed homogeneously in equal numbers in the groups, control (CO) without vaccine, intranasal (IN) with one dose of the intranasal and intramuscular (IM) vaccine with two doses of the intramuscular vaccine. On days D0, prior to the first vaccine dose, D3, D7 and D21 after the last vaccination dose, bronchoscopies of the airways were performed to observe presence of irritation in the region and to collect bronchoalveolar lavage (BAL) samples for IgA measurement by ELISA, cytological counting and evaluation, by optic microscopy and oxidative metabolism of bronchoalveolar cells by the NBT test. In the IN group, the significant alterations were nasopharyngeal irritation in D3 and D7 (P = 0.02), increase in BAL cellularity in D7 and D21 (P = 0.03), with increase of neutrophils in D7 (P = 0.0004) and reduction of alveolar macrophage (P = 0.01), reduction of cellular oxidative metabolism in D7 (P = 0.07), and increase of IgA in D3 (P = 0.04). The IM group presented nasopharyngeal irritation in the time interaction without statistical significance (D3, D7 and D21) and with statistical significance in the treatment interaction in relation to the CO group in D21 (P = 0.02), this group also presented a significant reduction of macrophages alveolar cells in D7 (P = 0.04). Despite changes in the respiratory tract of animals vaccinated via IN and IM, no animal in the present study presented clinical signs of respiratory disease or changes in the blood count. It can thus be concluded that commercial vaccines against CRB produce bronchoalveolar inflammation in the period of establishment of vaccination immunity, but under conditions of low environmental challenge did not promote conditions for the occurrence of respiratory disease.

INDEX TERMS: Alveolar macrophages, neutrophils, reactive oxygen species (ROS), immunoglobulin IgA, calves.

---

[1]Recebido em …….
Aceito em…….

[2] Mestranda em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) R. Simeão Varela de Sá, 03-Vila Carli, Guarapuava-PR, 85040-080. *Autor para correspondência: patisrossi@gmail.com

[3]Graduandos de iniciação científica do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) R. Simeão Varela de Sá, 03 - Vila Carli, Guarapuava - PR, 85040-080. E-mails: rafa_2mattei@yahoo.com.br,natalischllemer@hotmail.com,thomaz.gabis@gmail.com,antunesanna@outlook.com

[4] Mestrando em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) R. Simeão Varela de Sá, 03-Vila Carli, Guarapuava-PR, 85040-080. E-mail: mauricio@cdagroindustrial.com.br

[5]Médica Veterinária, DSc, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro Oeste

(UNICENTRO) R. Simeão Varela de Sá, 03 - Vila Carli, Guarapuava - PR, 85040-080. E-mail: hbertagnon@hotmail.com

RESUMO. Objetivou-se com este estudo comparar os efeitos de duas vacinas comerciais contra viroses respiratórias bovinas, uma intranasal e outra intramuscular, no perfil citológico, metabolismo oxidativo celular e na produção de imunoglobulina IgA da região broncoalveolar de bezerras sadias. Foram utilizadas 21 bezerras da raça Jersey sadias, com idade de 18 (±2 meses) e peso 200 kg (± 50 kg), distribuídas homogeneamente em igual número nos grupos, controle (CO) sem vacina, intranasal (IN) com uma dose da vacina intranasal e intramuscular (IM) com duas doses da vacina intramuscular. Nos dias D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 após a última dose vacinal, foram realizadas broncoscopias das vias aéreas para observar presença de irritação na região e realizar colheita de amostras de lavado broncoalveolar (LBA), para mensuração de IgA pela técnica de ELISA, contagem e avaliação citológica, por microscopia optica e do metabolismo oxidativo de células broncoalveolares pelo teste de NBT. No grupo IN, as alterações significativas encontradas foram presença de irritação em nasofaringe no D3 e D7 (P=0,02), aumento de celularidade em LBA no D7 e D21 (P=0,03), com aumento de neutrófilos no D7 (P=0,0004) e redução de macrófago alveolar (P=0,01), redução do metabolismo oxidativo celular no D7 (P=0,07), e aumento de IgA em D3 (P=0,04). O grupo IM apresentou irritação em nasofaringe na interação tempo sem significado estatístico (D3, D7 e D21) e com significado estatístico na interação tratamento em relação ao grupo CO em D21 (P=0,02), este grupo também apresentou redução significativa de macrófagos alveolares no D7 (P=0,04). Apesar das alterações no trato respiratório dos animais vacinados via IN e IM nenhum animal do presente estudo apresentou sinais clínicos de doença respiratória ou alterações no hemograma. Podendo-se assim concluir que as vacinas comerciais contra o CRB produzem inflamação broncolaveolar no período de estabelecimento da imunidade vacinal, mas em condições de baixo desafio ambiental não promoveram condições para que ocorre-se o estabelecimento de doença respiratória.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Macrófagos alveolares, neutrófilos, espécies reativas de oxigênio (EROs), imunoglobulina IgA, bovinos.

INTRODUÇÃO

O complexo respiratório bovino (CRB) é uma enfermidade multifatorial relacionada a uma interação complexa entre fatores estressores ambientais, susceptibilidade imune dos animais e patógenos respiratórios como os vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BoHV-1), Parainfluenza tipo 3 (bPIV-3), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) e vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) (Cusack et al. 2003, Andrews et al. 2008). Esses microrganismos comprometem a barreira física de mucosas, o sistema mucociliar e a defesa celular inata (Edwards 2010). Assim quando bactérias comensais do trato respiratório anterior como *Mannhemia haemolytica* e *Pasteurella multocida* são inaladas, a reduzida defesa pulmonar permite que elas colonizem os pulmões causando pneumonia bacteriana secundaria (Svensson & Liberg 2006).

Inúmeros protocolos são elaborados para o controle desta enfermidade. Os mais frequentemente utilizados estão relacionados à metafilaxia, na qual os animais recebem uma dose única de antibiótico ao chegarem ao confinamento ou a profilaxia, na qual os animais recebem uma a duas doses de vacina contra patógenos respiratórios entre sete a 15 dias antes de chegarem ao confinamento (Taylor et al. 2010).

Tendo em vista que a metafilaxia pode induzir a resistência bacteriana e resíduos químicos no organismo animal, a profilaxia torna-se uma medida mais acertiva para o controle do CRB. Atualmente no mercado brasileiro, a maioria das vacinas são constituídas por complexos direcionados contra os agentes virais BoHV-1, BVDV, bPIV-3 e BRSV, indicados para administração subcutânea (Edwards 2010), intramuscular (Neutra & Kozlowski 2006) ou intranasal (Ellis et al. 2007, Xue et al. 2010, Socha et al. 2013, Cortese et al. 2017).

As vacinas intranasais, são uma alternativa em potencial, visto que não causam dor no local de aplicação e possuem capacidade de induzir resposta imune local superior à vacinação sistêmica, estimulando uma maior produção de IgA local (Neutra & Kozlowski 2006). Porém Gomes (2016) observou redução na porcentagem e na função de macrófagos alveolares de bezerros neonatos vacinados por esta via, sugerindo uma possível redução nas defesas respiratórias contra bactérias. Tal fato pode ocorrer porque a vacina promove resposta imunológica semelhante a que ocorre na infecção viral natural (Dou et al. 2015), gerando-se a dúvida se a vacina intranasal pode predispor a maior susceptibilidade de infecções bacterianas secundarias durante o período do estabelecimento da imunidade vacinal, que ocorre entre 1 a

3 semanas após a última dose da vacinação (Gomes et al. 2015).

As vacinas intramusculares ou subcutâneas são efetivas no controle do CRB, pois estimulam também resposta imune local, mesmo que em menor proporção em relação à administração intranasal (Neutra & Kozlowski 2006). Como este desafio para a mucosa nasal é menor, acredita-se que afete menos a efetividade celular do trato respiratório, resultando possivelmente em menor susceptibilidade a infecções bacterianas secundarias durante o período de desafio vacinal.

Embora muitas pesquisas já tenham sido realizadas com diferentes vias de administração vacinal contra viroses respiratórias, a atenção principal é para produção de anticorpos e soroneutralização, posteriormente ao periodo de estabelecimento da imunidade vacinal e quase nenhuma delas foca nos efeitos da vacina sobre as células broncoalveolares e uma possível imunossuceptibilidade a doenças bacterianas durante este estabelecimento da resposta vacinal (Gershwin et al. 1998, Fulton et al. 2003, Hishiki et al. 2004).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo comparar os efeitos das vacinas comerciais intranasal e intramuscular contra CRB na citologia, função celular e na produção de imunoglobulina IgA da região broncoalveolar de bezerras sádias, durante o período de estabelecimento da imunidade vacinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em uso animal /UNICENTRO (018/2017).

Foram selecionadas 21 bezerras da raça Jersey, com idade de 18 meses (±2 meses) e peso 200kg (± 50 kg), pertencentes da Unidade Didática de Bovinocultura de Leite da UNICENTRO, vermifugadas, sem previa vacinação e com alimentação composta por pasto de aveia e azevem e silagem de milho. Como critério de inclusão amostral foi realizado o hemograma e exame físico completo desses animais, previamente a sua entrada no experimento e nos dias do experimento, avaliando-se o estado geral das bezerras, e seus parâmetros de frequências cardíaca e respiratória, ausculta pulmonar e traqueal, temperatura, motilidade intestinal, coloração de mucosas, palpação de linfonodos e tempo de preenchimento capilar, bem como avaliação broncoscopica dos animais. Animais que apresentassem alguma alteração nessas avaliações foram retirados do experimento.

Estes animais foram distribuídos aleatoriamente em números iguais em um dos grupos, controle (CO), intranasal (IN) ou intramuscular (IM) conforme a forma de vacinação adotada. Os animais do CO não receberam vacina alguma, os do grupo IN receberam 2 mL em dose única da vacina comercial (Inforce 3®, Zoetis, Brasil) composta por vírus BoHV-1, bPIV-3 (amostras termo sensíveis) e BRSV (amostra atenuada) sendo administrado 1 mL em cada narina, sendo mantida sua cabeça elevada por aproximadamente 1 minuto, e o grupo intramuscular (IM) foi vacinado com duas doses de 2 mL com intervalo de 21 dias da vacina comercial composta por amostras vivas termos sensíveis (atenuadas) dos vírus BoHV-1, bPIV-3, BRSV (amostra atenuada) e BVDV (amostra inativada), composta por cepas 5960 citopática e 6309 não citopática, (Cattle Master 4®, Zoetis, Brasil).

Os animais foram então submetidos à avalições broncoalveolares por inspeção do trato respiratório e colheitas de lavado broncoalveolar (LBA) para analises de contagem e perfil citológico, mensuração do metabolismo oxidativo e quantificação de IgA da região broncoalveolar nos momentos D0, antes da aplicação da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal (Fig.1).

Para as broncoscopias, os animais foram previamente sedados com xilazina (Anasedan®-cevaBRA) na dose de 0,02 mg/kg intravenosa. Foi então realizado o exame endoscópico e as colheitas de LBA por videoendoscópio flexível (EC-250LP5, Fujinon® 1.690 mm X ø11 mm) passado por uma das narinas até alcançar a região dos brônquios, até encontrar resistência à passagem. Nesta abordagem, atribuiu-se escore de irritação do trato respiratório, considerando se escore 1 como mucosas lisas brilhantes e normocoradas, escore 2, mucosa avermelhada, vasos evidenciados e irregularidades em nasofaringe; escore 3 os mesmos sinais de irritação em traqueia e escore 4 os mesmos sinais de irritação em nasofaringe e traqueia.

Após a inspeção de todas as regiões do trato respiratório, promoveu-se o lavado broncoalveolar, instilando-se 30 mL de solução fisiológica 0,9% estéril a temperatura ambiente em cada brônquio e depois succionou-se a solução por bomba a vácuo conforme técnica descrita por Batista et al, (2012) com modificações. Posteriormente as amostras foram armazenadas em tubos de polietileno e resfriadas, sendo processadas em até 2 horas pós-coleta.

As amostras de lavado foram então centrifugadas a 1000g X 15 minutos a 4ºC, e sendo o sobrenadante acondicionado e congelado para mensuração de IgA inespecífica, pelo conjunto comercial de ELISA (IgA Cow ELISA Kit®, Abcam), conforme recomendação do fabricante.

O pellet celular foi então ressuspendido com 1 mL de PBS e submetido a contagem e viabilidade celular pela técnica do azul de tripan. Todas as amostras apresentaram viabilidade maior que 90%, então a suspensão celular foi ajustada para 2 x 10^6 células viáveis/mL, para a avaliação do metabolismo celular e para a avalição citológica.

Para avaliação do metabolismo oxidativo realizou-se a prova colorimétrica do teste de NBT (Artner et al, 2018). Foram adicionados 100 µl de LBA a 100 µl de NBT (Sigma®) a 1% estimuladas com 5µL de 12 miristato 13 acetato de forbol miristato (PMA a300 ng/mL, Sigma®) em tubos de ensaio, incubados por 30 min a 37ºC. Após a parada da reação por meio da adição de 2000µL de EDTA (3mM) gelado, o NBT externo foi removido após lavagem com metanol (Synth®) e as células foram dissolvidas com KOH (Synth®) (3M, 120 µL) e DMSO (Dimesol®- Marcolab)(99%, 140 µL), sendo feita a leitura das microplacas em leitor de ELISA (Thermo Plate TP – Reader®), em filtro 630 nm.

Para avaliação citológica, 200 µL de lavado broncoalveolar foi citocentrifugado, a 400g por 6 minutos, fixando-se o pellet celular com metanol (Synth®), e corando com Panótico Rápido®. Para a contagem diferencial das células, foi utilizado microscópio óptico, sendo contadas 300 células em aumento de 1000x, classificadas em macrófagos simples, macrófagos gigantes, neutrófilos, linfócitos, células epiteliais e eosinófilos.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software estatístico Instat Graphpad®. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos dados paramétricos, foram realizados os testes de Anova paramétrico e teste de Tukey como pos teste. Os dados avaliados em escore foram submetidos ao teste Anova não paramétrico e ao pos teste de Dunn. Os dados foram considerados com significância estatística quando $P \leq 0,05$ e a tendência estatística quando $P > 0,05 \leq 0,1$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento, foram retiradas duas bezerras do grupo IM e duas do Grupo CO por apresentarem em algum dos momentos experimentais, alterações no hemograma compatíveis com doenças infecciosas de origem não respiratória, baseado nos achados da broncoscopia e exame físico respiratório. Desta maneira o experimento foi realizado com, cinco animais no grupo controle (CO), sete animais no grupo intranasal (IN) e cinco animais no grupo intramuscular (IM). Esses animais não apresentaram anormalidades no exame físico nem no hemograma, no decorrer do período experimental, conforme os valores de referência apresentado por Feitosa (2014).

Os dados do presente trabalho demonstram que a vacina comercial intranasal contra o complexo respiratório bovino causou mais alterações no trato respiratório que a vacina intramuscular no decorrer do período em que ocorre o estabelecimento da imunidade vacinal, possivelmente porque neste período de 21 dias podem ocorrer viremias induzidas por esta via de vacinação (Fulton et al. 2003, Socha et al. 2013, Gomes et al. 2015, Walz et al. 2017). Estas alterações foram referentes aumento da produção de IgA na região broncoalveolar inicial, seguido posteriormente por irritação da nasofaringe, aumento da celularidade com alteração no perfil citológico, redução do metabolismo oxidativo bem como, conforme explicitados na Fig 2 e nos Quadro 1 ao Quadro 3, respectivamente.

De acordo com o metabolismo oxidativo das células broncoalveolares (Quadro 3), pode-se observar que os animais dos grupos CO e IM não apresentaram diferenças significativas em relação aos momentos avaliados. Já o grupo IN apresentou redução desta variável, em D7 e D21 em relação aos demais momentos avaliados (tendência à significância P=0,07).

O metabolismo oxidativo é um mecanismo antibacteriano dependente de oxigênio, que ocorre em neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e monócitos (Fonteque et al. 2015). Essa função das células de defesa é iniciada a partir da fagocitose celular, ocorrendo então a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais dão origem a metabólitos oxidantes, que realizam à eliminação dos patógenos internalisados (Burgos et al. 2011, Fonteque et al. 2015). Esse mecanismo é importante para manter o trato respiratório hígido, e se essa atividade estiver reduzida, ocorre dificuldade na eliminação de agentes infeciosos, consequentemente aumentando a chance de desenvolvimento de pneumonias bacterianas (Du Manoir et al. 2002, Bertagnon et al. 2017). Desta maneira, os resultados da presente pesquisa, demonstram que a vacina IN levou a uma redução na capacidade fagocitica e oxidativa de neutrófilos e macrófagos a nível pulmonar, podendo assim ocorrer dificuldade na eliminação de patógenos no trato respiratório posterior e conseguentemente uma possivel susceptibilidade a infecções secundárias durante o período de estabelecimento da imunidade vacinal.

Similarmente nestes mesmos momentos (D7 e D21), houve um aumento significativo da celularidade no grupo IN em D7 e D21 em relação a D0 (P=0,03) na interação tempo, enquanto que nos outros grupos, esta variável se manteve constante (Quadro 2).

Em D0, a citologia do lavado broncoalveolar era composta predominantemente por macrófagos alveolares, (macrófagos simples-83,60% e macrófagos gigantes alveolares 2%), seguidos por neutrófilos (7,52%), linfócitos (5,33%), eosinófilos (1,67%) e células epiteliais (0,58%) nos três grupos, o que esta de acordo com a literatura a respeito das porcentagens celulares encontradas na região broncoalveolar de bovinos sadios (Allen et al. 1992).

Ao longo do tempo, o grupo IN apresentou aumento estatístico de neutrófilos e redução estatística de macrófagos gigantes em D7 em relação ao momento DO (P=0,02, P=0,01 respectivamente) na interação tempo, com e redução estatistica de macrófagos gigantes alveolares em relação ao grupo CO em D7(P=0,001), e sem interação do tratamento para neutrófilos neste mesmo período (P>0,05) (Quadro 2). Este influxo neutrofilico pode ter ocorrido porque os neutrófilos são as primeiras células de defesa a serem recrutadas durante um estado inflamatório, em respota a estímulos que micro-organismos ou partículas inaladas provocam no sistema respiratório (Griffin et al. 2010).

Redução da função de macrófagos alveolares e aumento de celularidade por aumento de neutrófilos na região broncoalveolar também foram relatados por Gomes (2016), ao utilizar uma vacina comercial contra o CRB por via IN em bezerros neonatos, sugerindo que esta via de administração reduz as defesas do trato respiratório, o que induz a um influxo neutrofílico compensatório com aumento da celularidade regional, para manter o trato respiratório hígido.

Soma-se ainda a irritação de nasofaringe que o grupo IN apresentou em D3 e D7 em relação aos demais momentos (P=0,02) (Quadro 1), o que reforça a hipótese de que a vacina IN promove irritação e inflamação no trato respiratório.

Embora o grupo controle também tenha apresentado aumento significativo de neutrófilos e diminuição de macrófagos simples em D7 relação aos demais momentos (P=0,0004; P=0,0002 respectivamente), não houve aumento alteração dos macrófagos gigantes, nem da celularidade, irritação da nasofaringe ou alteração do metabolismo oxidativo, indicando que à repetibilidade da técnica de broncoscopia, causam inflamação leve na região, seja por carrear microorgansimos do trato respiratório anterior para a região posterior, como também por abrasão local por provocada pela passagem do endoscopio. Toda a agressão seja ela mecânica ou biológica leva a liberação de substâncias quimiotáxicas que causam a mobilização de células inflamatórias para o local lesado, ocorrendo principalmente o deslocamento de neutrófilos, proporcional ao grau de inflamação gerado. Como no D21 houve retorno das proporções normais entre macrófagos e neutrófilos, acredita-se que o período de 15 dias entre D7 e D21 é o tempo suficiente para resolver a inflamação gerada pela técnica (Vianna et al. 2016, Shecaira & Paulo 2017).

Em relação à resposta imune humoral, ressalta-se que a principal imunoglobulina produzida em mucosas é a IgA, sendo a responsável pela proteção dos sistemas gastrointestinal, respiratório e urogenital. Sua principal função é promover o aprisionamento de antígenos ou microrganismos no muco, impedindo o contato direto de patógenos com a superfície da mucosa. Embora a IgA não apresente ação bactericida, ela neutraliza vírus e enzimas virais e bacterianas, além de impedir que bactérias penetrem em mucosas (Abbas et al. 2008). Diante disto, observou-se que o grupo IN apresentou aumento significativo de IgA broncoalveolar em D3 (P=0,04) em relação a D0 e posteriormente estes teores não diferiram estatisticamente de D0 ou D3 (Fig.2).Os dados do presente trabalho corroboram com Cortese et al. (2017) os quais observaram, que vacas vacinadas 24 horas após o parto com uma vacina com VVM intranasal contento BoHV-1, BRSV e bPIV-3, tiveram aumento significativo (P<0,05) nos níveis de IgA em secreções nasais nos momentos iniciais após a vacinação (quatro e sete dias após a vacinação).

O aumento de IgA no grupo IN também pode estar relacionado a capacidade que essa via de imunização de mucosa tem de estimular a produção de IgA local via tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) no trato respiratório (Hishiki et al. 2004, Gomes 2016).

No entanto os valores de IgA no grupo IN, não ultrapassaram os valores do grupo CO na maioria dos momentos avaliados. Vale ainda ressaltar que os animais do grupo CO já apresentavam maiores teores significativos de IgA em D0 em comparação aos demais grupos (P=0,03) (Fig.2). Esses teores se mantiveram estáveis nos dias três e sete, e aumentaram no dia 21 (P=0,38).

Como a secreção de IgA pode ser estimulada pela técnica de colheita de LBA, na qual o endoscopio carrea para o trato respiratório inferior uma quantidade considerável de microrganismos, levando a produção local de imunoglobulinas ou causando lesões na parede subepitelial do trato respiratório com extravasamento de constituintes séricos para o lúmen pulmonar (Bertagnon et al. 2007) acredita-se que a

repetitibilidade da técnica continuou a estimular a produção da imunoglobulina no grupo CO, no entanto, como neste grupo não houve redução da resposta imune celular, não ocorreu o consumo desta imunoglobulina. Já no grupo IN, a ausência de aumento desta imunoglobulina no D7 e D21 poderia ser atribuída ao consumo da imunoglobulina, que poderia estar sendo utilizada para neutralização de patógenos em razão da menor eficiencia de resposta imune celular. Não se tem dados na literatura sobre esta possibilidade, sendo importante a realização de trabalhos que avaliem se esta resposta poderia ocorrer após a vacinação intranasal contra o CRB.

Embora o grupo IN tenha manifestado aumento de resposta humoral no D3, e irritação de nasofaringe em D3 e D7 e redução da resposta celular nos momentos posteriores (D7 e D21), nenhum animal teve manifestação clínica de doença respiratória nem alteração no leucograma, o que permite inferir que nas condições de manejo dos animais estudados nesta pesquisa, a vacina comercial IN não aumentou a ocorrência de infecções bacterianas secundárias no trato respiratório, condição semelhantes à encontrada por Xue et al. (2010) que ao vacinarem bezerros com vacinas vivas modificadas contra BoHV-1, BVDV, BRSV e bPVI-3 via intranasal, não observaram alterações em relação ao leucograma e incidência clínica pós-vacinal.

Cabe ressaltar que não houve manifestação clínica de doença respitória em nenhum animal dos diferentes grupos avaliados, isso pode ser relacionado às condições em que a presente pesquisa foi realizada, estudou-se animais em crescimento, lotados em pastos e em boas condições nutricionais, o que geralmente não é encontrado nas populações bovinas com maior risco de apresentarem CRB, como bovinos em confinamento, bezerros recém nascidos ou em lotes de desmame (Edwars 2010). Desta maneira sugere-se que estudos sejam feitos também em bovinos expostos a condições de maior desafio ambiental, pois há relatos de que vacinas contra viroses respiratórias aplicadas pela via intranasal, geram o derramamento viral nas secreções nasais após a vacinação (Socha et al. 2013) e foram associadas a um maior risco de mortalidade por pneumonias em bovinos confinados (Martin et al. 1980).

Em relação ao grupo IM as únicas alterações encontradas foram redução de macrófagos gigantes alveolares em D7 em relação a D0 e D3 (P=0,04) e em relação ao controle (P=0,001) no mesmo período sem alteração da celularidade (Quadro 2), e irritação em nasofaringe em D3, D7 e D21, com significância de valor biológico embora não estatístico na interação tempo (P=0,99), e com aumento estatístico em relação ao grupo CO e IN no D21 (P=0,02)(Quadro 1). Embora não tenha ocorrido influencia estatística da vacina IM no metabolismo oxidativo, nem na produção de IgA (Quadro 3 e Fig 2 respectivamente), o comportamento destas variáveis foram semelhantes ao do grupo IN, indicando que a vacina IM promove uma alteração local celular e humoral de menor magnitude em comparação com a vacina IN, tal qual observado em previas pesquisas, que verificaram que vias de imunização da mucosa induzem uma maior a produção de IgA no local de aplicação, embora nehuma pesquisa tenha estudado os efeitos da vacina na defesa celular broncolaveolar (Neutra & Kozlowski 2006, Ellis et al. 2007, Cortese et al. 2017).

Como ambas as vacinas utilizadas contêm em sua formulação agentes virais vivos modificados contra BoHV-1, bPVI-3 e BRSV, pode ocorrer infecções virais pela vacina, pois os agentes patogênicos presentes na formulação, embora passem por métodos específicos de atenuação para reduzir sua patogenicidade, ainda mantem sua capacidade de multiplicação no hospedeiro, podendo ocorrer reversão da virulência e assim estes microrganismos vacinais podem causar uma imunossupressão e consequentemente causar a doença no hospedeiro (Schatzmayr 2003, Meeusen et al. 2007).

Avaliando efeito de vacinas contra o CRB, Fulton et al. (2003) observaram que animais vacinados com vacina modificada por via intramuscular contra BoHV-1 e BVDV-1, apresentaram aumento de leucócitos sanguíneos entre 3 a 7 dias após a segunda dose vacinal. Diferentemente do presente trabalho, no qual não ocorreu alteração no leucograma dos animais vacinados via IN ou IM.

Embora ainda sejam escassos os relatos quanto à capacidade de vacinas contra doenças respiratórias bovinas aplicadas por via intranasal ou parenteral levarem a enfermidade, permanece a preocupação em relação à possibilidade dos vírus atenuados conseguirem apresentar a reversão da virulência (Schatzmayr 2003, Meeusen et al. 2007, Xue et al. 2010, Socha et al. 2013), tornando-se necessário realizar mais estudos com diferentes condições de desafio ambiental e o uso das vacinas comerciais contra as viroses respiratórias.

CONCLUSÃO

A partir dos dados avaliados conclui-se que as vacinas comerciais contra o CRB produzem inflamação broncoalveolar no período de estabelecimento da imunidade vacinal, mas em condições de baixo desafio ambiental não promovem doença respiratória. Tal fato se deve porque a vacina comercial intranasal promoveu aumento da imunidade humoral três dias após a aplicação da vacina e redução da

resposta imune celular posteriormente na região broncoalveolar enquanto a vacina comercial intramuscular promoveu alterações semelhantes, porém mais tênues.

Agradecimentos.

A Capes/Fundação Araucária pela concessão da bolsa, ao CNPq, projeto 431688/2018-4. A Zoetis pela disponibilização das vacinas e auxilio na publicação e divulgação dos dados da pesquisa.

REFERÊNCIAS

Allen J.W., Viel L., Bateman K.G., Rosendal S & Shewen P.E.1992. Cytological Findings in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Feedlot Calves : Associations with Pulmonary Microbial Flora. Can. J. Vet. Res.56(2):122–126.

Artner B., Reck A., Coelho A.M., Prediger J.J., Pontarolo D.V. & Bertagnon, H.G. 2018. Assessment of the oxidative metabolism of calves' bronchoalveolar cells: comparison between NBT and fluorimetric techniques. Arq. Inst. Biol. 85. p. 1-5.

Batista C.F., Blagitz M.G., Santos B.P., Bertagnon H.G., Parra A.C., Vianna R.S., De Lucca G.G., Lima D.M. & Santos D.S., Dellalibera A.M. 2012. Maturation of mononuclear phagocytes in the lungs of young calves-In vitro study. J. Dairy Sci. 10:5909-5915.

Bertagnon H.G., Batista C.F., dos Santos B.P., Lima M.G.B., Bellinazzi1. & Della Libera A.M.M.P.2017. Influence of orchiectomy of seven month old bulls on bronchoalveolar immune function. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 69(2):310-316.

Bertagnon H.G., SilvaP.E.G., Wachholz L., Leal M.L.R., Fernandes W.R. & Benesi, F.J.2007. Imunoglobulinas no trato respiratório de bezerros sadios durante o primeiro mês de vida. Pesq. Vet. Bras. 27(12):487-490.

Burgos R.A., Conejeros I., Hidalgo M.A., Werling D. & Hermosilla C. 2011.Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. Vet. Immunol. Immunopathol. 143(1/2):1-10.

Cortese V.S., Woolumsb A., Hurleyc D.J., Berghausc R., Bernardd J.K. & Shorte T.H. 2017. Comparison of interferon and bovine herpesvirus-1-specific IgA levels in nasal secretions of dairy cattle administered an intranasal modified live viral vaccine prior to calving or on the day of calving, Vet. Immunol. Immunopathol. 187:35–41.

Cusack P.M.V, McMeniman N. & Lean I.J. 2003. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. Aust. Vet. J. 81 (8):480–7.

Dou Y., Fu B., Sun R., Li W., Hu W., Tian Z. & Wei H. 2015. Influenza Vaccine Induces Intracellular Immune Memory of Human NK Cells. PLoS ONE.10 (3):1-17.

Du Manoir J.M., Albright B.N., Stevenson G., Thompson S.H., Mitchell G.B., Clark M.E. & Caswell J.L. 2002.Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. Vet. Immunol. Immunopathol. 89(3/4):175–186.

Edwars T.A. 2010.Control Methods for Bovine Respiratory Disease for Feedlot Cattle. Vet Clin. Food Anim. 26: 273-273.

Ellis J., Gow S., West K., Waldner C., Rhodes C., Mutwiri G. & Rosenberg H. 2007. Response of calves to challenge exposure with virulent bovine respiratory syncytial vírus following intranasal administration of vacines formulated for parenteral administration. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230(2):233-243.

Feitosa F.L.F. 2014. Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico, Roca, São Paulo. 841p.

Fonteque J.h., Saito M.E., Rizelo P.A., Teixeira W.T & Kohayagawa A. 2015. Comparação entre duas metodologias para a realização do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 35(1):1-4.

Fulton R.W., Saliki J.T., Burge L.J. & Payton M.E. 2003. Humoral Immune Response and Assessment of Vaccine Virus Shedding in Calves Receiving Modified Live Virus Vaccines Containing Bovine Herpesvirus-1 and Bovine Viral Diarrhoea Virus 1. J.Vet. Med. 50(1):31-17.

Gershwin L.J., Schelegle E.S., Gunther R.A., Anderson M.L., Woolums A.R., Larochelle, D. R., Boyle G.A., Friebertshauser KE. & Singer R.S. 1998. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. Vaccine. 16(11/12):1225-1236.

Gomes C.G., Bertagnon H.G., Batista C.F., Santos K.R. & Della Libera A.M.M.P. 2015. Caracterização Leucocítica Pulmonar de Bezerros Após Vacinação Intranasal. Revista O Biológico – Suplementos. 77: p.235-236.

Gomes R.C.2016. Influência etária na resposta imunológica de bezerros à vacinação intranasal. Tese de Doutorado. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-22092016-113115/es.php> Acesso em 13 mai. 2018.

Griffin D., Chengappa M.M., Kuszak J. & McVey D. S. 2010. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 26(2):381-394.

Hishiki H., Zuercher A.W., Valosky J. & Coffin S.E. 2004. Regional differences in the early mucosal immune response induced by primary inoculation of mice with respiratory syncytial vírus. Microb. Pathog. 36(3):141-146.

Martin S.W., Meek A.H., Davis D.G., Thomson R.G., Johnson J.A., Lopez A., Stephens L., Curtis R.A., Prescott J.F., Rosendol S., Savon M., Zuboidy A.J & Bolton M.R. 1980. Factors associated with mortality in feedlot cattle: the bruce county beef cattle project. Can. J. Comp. Med. 10(1):1–10.

Meeusen E.N.T., Walker J., Peters A., Pastoret P.P. & Jungersen G. 2007.Current status of veterinary vacines. Clin. Microbiol. Rev. 20(3):489-510.

Neutra M.R. & Kozlowski P.A. 2006.Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nat. Rev. Immunol. 6(2):148–158.

Schatzmayr H.G. 2003. Novas perspectivas em vacinas virais. História, Ciências, Saúde. Manguinhos. 10(2):655-69.

Shecaira C. L. 2017. Avaliação da influência da produção de citocinas no perfil de resposta imunitária em bezerros nos primeiros 30 dias de vida. Tese (Doutorado). Disponivel em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-28022018-090158/es.php> Acesso em 05 jun. 2017.

Socha W., Rola J., Bednarek D., Urban-Chmiel R. & Żmudziński J.F. 2013. Shedding course of bovine respiratory syncytial vírus and bovine parainfluenza 3 virus in calves vaccinated intranasally. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 57(4):479-483.

Svensson C. & Liberg P. 2006. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. Prev. Vet. Med.73(1):43-53.

Tizard, I. R. 2014. Imunologia veterinária, Elsevier, Rio de Janeiro, p.521-557.

Taylor J.D., Fulton R.W., Lehenbauer T.W., Step D.L. & Confer A.W. 2010. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures?. Can. Vet. J .51 (12):1351–1359.

Vianna R. S., Batista C. F., Lima D. M., Santos K.R., Gomes R, C., Bertagnon H. G. & Della Libera A. M. M. P. 2016. Perfil citológico pulmonar de bezerros sadios nos três primeiros meses de vida. Pesq. Vet. Bras.36(5):447–452.

Walz, P. H., Newcomer, B. W., Riddell, K. P., Scruggs, D. W. & Cortese, V. S. 2017. Virus detection by PCR following vaccination of naive calves with intranasal or injectable multivalent modified-live viral vaccines. J. Vet. Diagn. Invest. 29(5):628–635.

Xue W., Ellis J., Mattick D., Smith L., Bradya R. & Trigo E. 2010. Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. Vaccine. 28(22):3784-3792.

LEGENDA DAS FIGURAS

Quadro 1. Presença de irritação em mucosa do trato respiratório de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Quadro 2. Valores totais e porcentagem das células broncoalveolares, de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Quadro 3. Metabolismo oxidativo de células broncoalvelares de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Fig.1. Dias de imunização e coleta de amostras de sangue LBA dos grupos submetidos a vacina intramuscular (A) e intranasal (B). Guarapuava, 2017

Fig.2. Presença de IgA em lavado broncoalveolar (LBA) de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Quadro 1. Presença de irritação em mucosa do trato respiratório de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Grupos	Momentos				
	D0	D3	D7	D21	P^X
CO					
Mediana	1aA	1 aA	1 aA	1 aA	0,39
Ic 5-95%	0,45-2,04	0,45-2,04	0,45-2,04	1-1	
IM					
Mediana	1 aA	2 aA	2 aA	2 aB	0,99
Ic 5-95%	0,49-2,71	0,92-2,28	0,92-2,28	0,92-2,28	
IN					
Mediana	1aA	2bA	2bA	1aA	0,02
Ic 5-95%	1-1	0,87-2,85	0,93-3,04	1-1	
P^Y	0,21	0,5	0,45	0,02	

IN: grupo vacina intranasal, IM: grupo vacina intramuscular, CO: grupo controle, sem vacina. Ic: Intervalo de confiança. D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam significância estatística na interação tempo, e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística na interação tratamento ($P<0,05$). 1 como mucosas lisas brilhantes e normocoradas, escore 2, mucosa avermelhada, vasos evidenciados e irregularidades em nasofaringe; escore 3 os mesmos sinais de irritação em traqueia e escore 4 os mesmos sinais de irritação em nasofaringe e traqueia.

Quadro 2. Valores totais e porcentagem das células broncoalveolares, de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Grupos	Momentos				
	D0	D3	D7	D21	P^x
	Neutrófilos (%)				
IN	5,28 aA ±2,01	9,05 abA±6,16	25,95 bA ±7,33	9,38abA±2,39	0,02
IM	13,13 aA ±4,17	6,67 aA ±4,78	12,13 aA ±4,33	3,07 aB ±1,68	0,29
CO	4,17 aA ±0,97	10,5 aA ±3,89	21,75 ab ±4,5	4,75 aB ±0,91	0,0004
P^Y	0,09	0,9	0,31	0,1	
	Macrófagos Simples (%)				
IN	83,95 aA ±2,25	84,24 aA ±9,16	70,28 aA±7,03	81,57 aA±6,9	0,22
IM	80,60 aA ±4,6	86,53aA±11,07	78,70 aA±4,46	92,53aA±2,01	0,12
CO	86,25 aA ±1,22	79,66aA ±3,6	69,0 bA±4,5	91,49aA±1,84	0,0002
P^Y	0,43	0,84	0,53	0,22	
	Macrófagos Gigantes (%)				
IN	1,95 aA±0,45	1,04 abA±024	0,67 bA±0,23	1,33 aA±0,31	0,01
IM	2,47 aA±0,43	1,8 abA±0,74	0,33 bA±0,26	1,13 aA±0,45	0,04
CO	2,00 aA±0,54	2,33 aA±1,12	3,57 aB±0,55	0,67 aA±0,14	0,12
P^Y	0,7	0,38	0,001	0,43	
	Linfócitos (%)				
IN	6,09 aA±1,51	5,38 aA±3,04	2,95aA±0,75	6,00 aA±463	0,79
IM	3,93 aA±1,2	4,6 aA±1,28	7,07 aA±3,1	2,60 aA±0,58	0,23
CO	5,33 aA±1,11	6,66 aA±0,89	4,65aA±1,21	2,92 aA±0,96	0,17
P^Y	0,54	0,86	0,28	0,55	
	Eosinófilos (%)				
IN	0,19 aA±0,19	0,05 aA±0,05	0 aA±0	0 aA±0	0,41
IM	0,39 aA±0,24	0,4 aA±0,32	0,13aA±0,13	0,27 aA±0,27	0,82
CO	1,67 aA±0,96	0,08 aA±0,08	0,82aA±0,82	0,17 aA±0,17	0,38
P^Y	0,09	0,34	0,28	0,46	
	Células Epiteliais (%)				
IN	2,52 aA±2.25	0,23 aA±0,14	0,14 aA±0,09	0,57 aA±0,42	0,44
IM	0 aA±0	0 aA±0	0,33aA±0,25	0,4 aA±0,32	0,24
CO	0,58 aA±0,34	0,63 aA±0,67	0 aA±0	0 aA±0	0,37
P^Y	0,54	0,37	0,41	0,67	
	Celularidade ($x10^5$/mL)				
IN	4,91±2,05aA	7,74±1,62abA	14,17±3,97bA	17,02±5,92bA	0,03
IM	4,2±0,62aA	6,01±2,16aA	7,87±2,1aA	9,37±3,44aA	0,53
CO	6,12±1,98aA	3,2±1,08aA	8,1±2,81aA	7,11±1,8aA	0,22
P^Y	0,26	0,3	0,46	0,6	

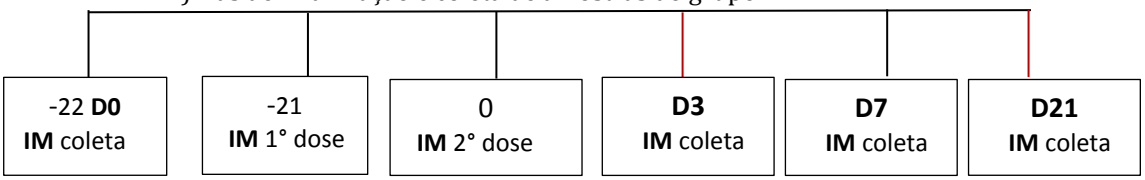
IN: grupo vacina intranasal, IM: grupo vacina intramuscular, CO: grupo controle, sem vacina. D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal. P^X interação tempo, P^Y interação tratamento. ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam significância estatística na interação tempo, e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística na interação tratamento (P<0,05).

Quadro 3. Metabolismo oxidativo de células broncoalvelares de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017

Grupos	Momentos				
	D0	D3	D7	D21	P^X
CO					
X	0,32±0,02aA	0,2±0,06 aA	0,16±0,04 aA	0,14±0,02 aA	0,11
IM					
X	0,26±0,06 aA	0,13±0,03 aA	0,1±0,03 aA	0,15±0,08 aA	0,26
IN					
X	0,24±0,03 aA	0,2±0,03 aA	0,15±0,02 aA	0,12±0,01 aA	0,07
P^Y	0,52	0,49	0,43	0,91	

IN: grupo vacina intranasal, IM: grupo vacina intramuscular, CO: grupo controle, sem vacina. D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal. P^X interação tempo, P^Y interação tratamento. X média, ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam significância estatística na interação tempo, e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística na interação tratamento ($P<0,05$).

A)Dias de imunização e coleta de amostras do grupo IM



B) Dias de imunização e coleta de amostras do grupo IN

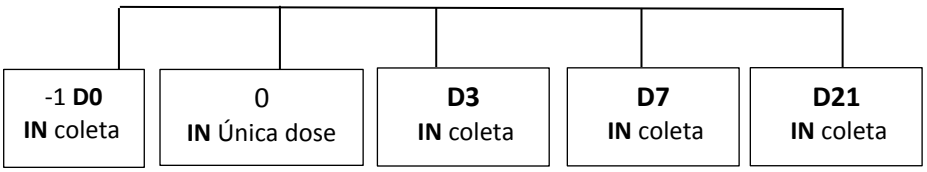


Fig.1. Dias de imunização e coleta de amostras de sangue LBA dos grupos submetidos à vacina intramuscular (A) e intranasal (B). Guarapuava, 2017 (IN: grupo vacina intranasal, IM: grupo vacina intramuscular, CO: grupo controle, sem vacina. D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal.

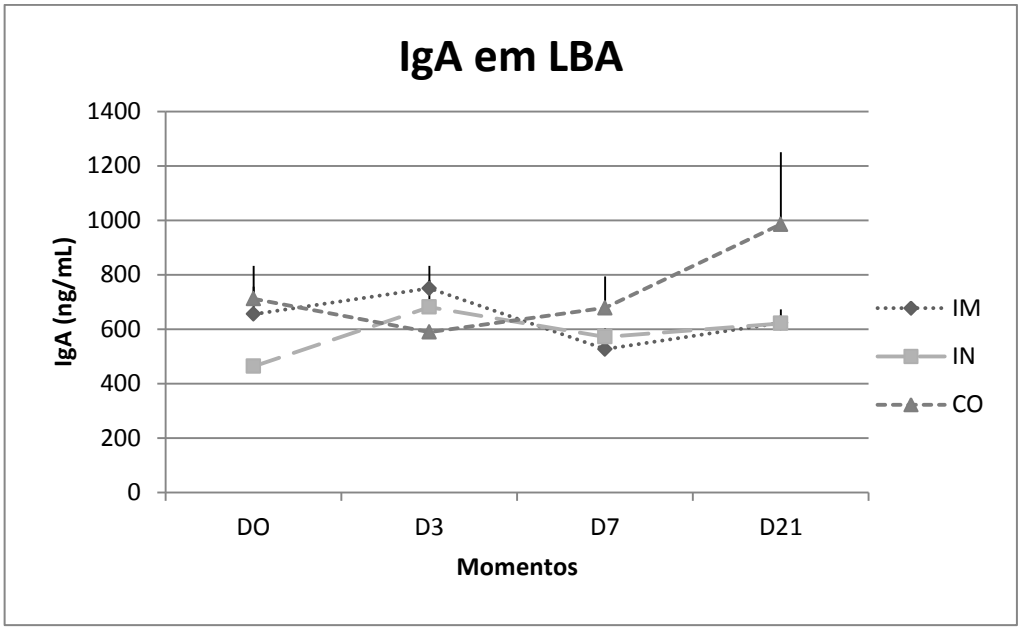


Fig.2. Presença de IgA em lavado broncoalveolar (LBA) de bovinos sadios submetidos a vacinas contra CRB. Guarapuava, 2017 (IN: grupo vacina intranasal, IM: grupo vacina intramuscular, CO: grupo controle, sem vacina. D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal.

ANEXOS

Anexo1. Normas de submissão para revista

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O **texto** deve ser formatado, em todos os pormenores, de acordo com as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br).

1. **Os artigos devem ser organizados em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (de preferência os últimos três separadamente), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu "nome para publicações científicas"**, como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores**. O autor para correspondência deve ser um autor que garante o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé devem ser mais uma vez elevados (sobrescritos), para aparecerem maiores e mais nítidos.

c) O **Cabeçalho do ABSTRACT** deve conter, além dos nomes dos autores abreviados invertidos, o ano, o TÍTULO, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Devem-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias.

d) O **Rodapé da primeira página** deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de "Inserir nota de fim", do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas).

e) O **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO, mas pode ser mais explicativo, seguido de "INDEX TERMS" que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de "ADDITIONAL INDEX TERMS".

f) O **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos "TERMOS DE INDEXAÇÃO" que incluem têrmos do título, por não se tratar somente de "TERMOS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS".

g) A **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo.

h) **MATERIAL E MÉTODOS** deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores.

i) Em **RESULTADOS** devem ser apresentados concisamente os dados obtidos.

j) Na **DISCUSSÃO** devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.

k) **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único).
l) Os **Agradecimentos** não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Lista de Referências.
m) A Lista de **REFERÊNCIAS** deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos (www.pvb.com.br).
(Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2.Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:
) Fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; página formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras.
b) ABSTRACT e RESUMO serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas.
c) A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal.
d) Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (**TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, etc.**), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).
e) Nos títulos dos Quadros e nas Legendas das Figuras os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto.
f) No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word.
Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, (P<0,05), 15h; de conveniência quando seguida de letra alta (35 kg ou 35kg, 4 h ou 4h). A abreviação de número é “no” e não “no”; grau Celsius é “oC” e não “oC”.
g) Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto!
h) Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;
i) Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso & Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra

minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004).
j) **Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados**; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. ..... título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências.
k) O uso de "comunicação pessoal" e de "dados não publicados" deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal).
l) As **Legendas das Figuras** devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de "Fig." seguida do número sem espaço, p.ex. "Fig.8. ...". Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos (www.pvb.com.br).
(Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada "subfigura" em **negrito** com parênteses claros antes do texto correspondente e devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada "subfigura", em parêntees e claros após o respectivo texto da legenda.)
m) O Título dos **Quadros** devem ser em **negrito**, sem ponto, e a "garganta" (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da "garganta" devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usem o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, com "a" em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista.

n) Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de **Figuras**). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, sem fundo e sem linhas horizontais.

3. **Apresentação das Figuras:**
a) As imagens devem ser salvas em 300 dpi, arquivo TIF.
b) Numerar cada figura separadamente (1, 2, ...).
c) Figuras com assuntos similares (subfiguras) devem ser agrupadas em pranchas com espaço entre elas de aprox. 1mm. Identifique cada imagem com uma letra maiúscula (A, B, ...) colocada no canto inferior esquerdo, de preferência fonte Arial 14, branca, em um quadro preto sem bordas.
d) Usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; para micrografias ópticas apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.
e) As legendas de Figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda = Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).

4. **Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa**; **na revisão final do artigo pelos autores,** antes da submissão, **isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).**

Exemplos de Referências

 Artigos publicados em periódicos:

Pavarini S.P., Soares M.P., Bandarra P.M., Gomes D.C., Bandinelli M.B., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Mortes súbitas causadas por *Amorimia exotropica* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 31(4):291-296.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. Environ. Health 17:15-24.

(Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. **O sinal "&" é usado para separar o penúltimo do último autor**. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra "Revista" deve ser abreviada como "Revta" em diferença a "Rev.", do inglês "Review". Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados "ponto-vírgulas" (;) em lugar de vírgulas.

 Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

 Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)

 Dissertações e Teses:

Silva R.M.M. 2016. Prevalência, identificação e distribuição das lesões abscedativas em caprinos e ovinos abatidos em um matadouro frigorífico no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 56p.

Sant´Ana V.A.C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese de Doutorado, Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 161p.

(Notem: (1) Deve-se evitar se referir a Dissertações ou Teses em vez de aos artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não

deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.
 Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.2):50-51. (Resumo)
Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)
(Note: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra!)

Anexo2. Hemograma de bovinos da raça Jersey

Hemácias /mm³	DO	D3	D7
CO X	7,35	7,27	7,53
SEM	0,53	0,27	0,32
IN X	7,55	7,77	7,66
SEM	0,38	0,32	0,32
IM X	7,26	6,92	7,34
SEM	2,25	9,16	7,03

Hematócrito%	DO	D3	D7	D21
CO X	36,25	32,72	33,76	35
SEM	1,08	1,04	1	1,15
IN X	30,69	31,91	31,29	30,71
SEM	0,99	0,99	0,97	1,98
IM X	34, 6	30,37	31,91	32,2
SEM	0,74	0,66	1,87	0,97

Hemoglobina g/dl	DO	D3	D7
CO X	10,87	11	11,3
SEM	0,35	0,23	0,26
IN X	10,28	11,08	10,87
SEM	0,51	0,37	0,37
IM X	11,5	10,2	10,78
SEM	0,26	0,2	0,51

Leucócitos/mm	DO	D3	D7	D21
CO X	8,89	8,93	8,66	10,85
SEM	0,43	0,55	1,17	0,81
IN X	10,68	9,5	9,76	8,87
SEM	1,07	0,94	0,93	0,63
IM X	11,02	7,72	9,16	10,86
SEM	2,34	1	1,3	0,48

Prot.Tot. plasm. g/dl	DO	D3	D7	D21
CO X	6,9	7	7,2	7
SEM	0,18	0,2	0,16	0,11
IN X	6,74	6,77	6,65	7
SEM	0,13	0,18	0,13	0,32
IM X	6,76	7,12	7,32	7,16
SEM	0,23	0,23	0,13	32

IN: grupo vacina intranasal, IM: grupo vacina intramuscular, CO: grupo controle, sem vacina. D0, antes da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal. X: média. SEM: desvio padrão. Prot.Tot. plasm : Proteína total plasmática. mm3: Milímetro cúbico. %: Porcentagem. mm: Milímetro. g/dl: Gramas por decilitro.

Figura 2. Figura com valores de hemograma completo de bovinos da raça Jersey, antes e durante o período experimental.

Anexo3. Valores de IgA

Tabela. Valores de media e desvio padrão de IgA no lavado broncoalveolar de bezerras saudáveis submetidas a vacinas contra o complexo respiratório bovino, Guarapuava 2017.

Grupos	**D0**	**D3**	**D7**	**D21**	
Intramuscular					**P^X**
	655,05±101,36aAB	750,07±82,276aA	526,08±31,751aA	622,63±26,589aA	0,23
Intranasal					
	463,4±21,3aA	680,99± 99,89bA	571,75±30,18abA	621,25± 51,26bA	0,04
Controle					
	711,85± 120,16aB	589,42± 22,57aA	678,02±115,74aA	985,21±264,91aA	0,38
P^Y	0,03	0,53	0,24	0,1	

P^x- interação tempo, P^y interação tratamento. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ao longo do tempo para o mesmo tratamento, Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os grupos. D0, antes da aplicação da primeira dose vacinal, D3, D7 e D21 (3,7 e 21 dias) após a última dose vacinal.