

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**RESPOSTA IMUNE INESPECÍFICA E ESPECÍFICA HUMORAL DE  
BEZERROS CURRALEIRO E NELORE VACINADOS COM  
*MYCOBACTERIUM BOVIS* - BCG**

Joyce Rodrigues Lobo  
Orientadora: Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA  
2009



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**  Dissertação  Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor: **Joyce Rodrigues Lobo** E-mail: **joycerl@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?  Sim  Não

Vínculo Empregatício do autor: \_\_\_\_\_ Agência de fomento: \_\_\_\_\_

País: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CNPJ: \_\_\_\_\_ Sigla: \_\_\_\_\_

Título: **RESPOSTA IMUNE INESPECÍFICA E ESPECÍFICA HUMORAL DE BEZERROS CURRALEIRO E NELORE VACINADOS COM MYCOBACTERIUM BOVIS - BCG** Palavras-chave: **anticorpos, vacina BCG, Pé-Duro, raças locais**

Título em outra língua: **Nonspecific and specific immune response humoral calves Curraleiro and Nelore vaccinated with Mycobacterium bovis - BCG**

Palavras-chave em outra língua: **antibodies, local breed, Pé-Duro, BCG vaccine**

Área de concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **09/12/2009**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Prof.ª Dr.ª Maria Clorinda Soares Fioravanti** E-mail: **clorinda@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Prof.ª Dr.ª Ana Paula Junqueira Kipnis** E-mail: **anapaula@iptsp.ufg.br**

Co-orientador(2): **Pesq. Dr.ª Raquel Soares Juliano** E-mail: **raquel@cpap.embrapa.br**

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?  total  parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

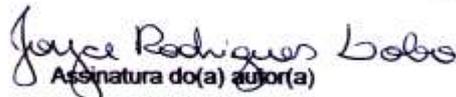
[ ] Capítulos. Especifique:

[ ] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 31 de maio de 2010

  
Assinatura do(a) autor(a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

JOYCE RODRIGUES LOBO

**RESPOSTA IMUNE INESPECÍFICA E ESPECÍFICA HUMORAL DE  
BEZERROS CURRALEIRO E NELORE VACINADOS COM  
*MYCOBACTERIUM BOVIS* - BCG**

Dissertação apresentada para obtenção  
do grau de Mestre em Ciência Animal  
junto à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**  
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Orientador (a):**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Clorinda Soares Fioravanti – UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis – UFG

Pesq. Dr.<sup>a</sup> Raquel Soares Juliano – EMBRAPA/CPAP

GOIÂNIA  
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

L799r Lobo, Joyce Rodrigues.  
Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros curraleiro e nelore vacinados com *Mycobacterium bovis* – BCG [manuscrito] / Joyce Rodrigues Lobo. - 2009.  
51 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Clorinda Soares Fioravanti.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Escola de Veterinária, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, quadros, abreviaturas.

1. Nelore Zebu) – Vacinação 2. Bezerros (Curraleiro) 3.  
*Mycobacterium bovis* – BCG I. Título.

CDU: 619:636.2

**JOYCE RODRIGUES LOBO**

Dissertação defendida e aprovada em **09/12/2009**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



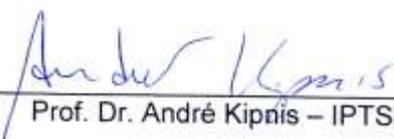
---

Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti  
(ORIENTADOR (A))



---

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera – USP/SP



---

Prof. Dr. André Kiprís – IPTSP/UFG

***Dedico a minha mãe Clarice Rodrigues C. Lobo,  
pelo apoio incondicional e incentivo  
em seguir a profissão de Médica Veterinária.  
Ao meu marido Sáudio Vieira Peixoto  
pelo companheirismo, paciência, incentivo e amor.***

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado meus passos para que eu pudesse chegar aqui.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Clorinda Soares Fioravanti pela amizade, dedicação, caráter ético exemplar, pela disposição em estar sempre pronta a ensinar e ajudar e principalmente pelo incentivo em toda minha vida acadêmica e até aqui.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis pela paciência, colaboração e inspiração para estudar sempre mais.

À Mayara Fernanda Maggoli companheira de projeto pela ajuda e por compartilhar não só os bons momentos, mas também os momentos difíceis desta jornada.

Aos colegas Gustavo Lage Costa, Lucas Jacomini Abud pelo esforço e dedicação e aos alunos de graduação Juliana, Patrícia, Letícia, Daniella, Nerissa e Bruno pela disposição em aprender e ajudar.

A equipe do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG Eduardo, Michelle, Bruna, Fernando, Adeliane, Aline Melo e Cinthya Fortes Fleury pela paciência e disposição.

A todos os meus familiares e do meu marido pela união, conforto e apoio em todos os anos.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, Helton Freires Oliveira e Laboratório de Anatomia Patológica, Antônio Souza da Silva pela paciência, disposição e ajuda nos momentos de dúvidas.

Aos demais colegas da pós-graduação pelos bons momentos vividos durante esta jornada.

Ao programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFG por proporcionar a oportunidade de aprendizagem.

Ao CNPq pela bolsa concedida e FUNAPE pelo apoio financeiro ao projeto.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles, amigos, colegas, professores, servidores que direta ou indiretamente contribuíram para o meu aprendizado e aprimoramento acadêmico.

“A curiosidade é mais importante  
do que o conhecimento.”

**Albert Einstein**

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Origem e histórico do gado Curraleiro.....	2
2.2 Resistência dos bovinos às enfermidades.....	4
2.3 Tuberculose bovina.....	6
2.4 Resposta imune.....	8
2.4.1 Resposta imune inata ao <i>M. bovis</i> .....	10
2.4.2 Resposta imune adaptativa.....	11
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Local de realização do estudo.....	22
4.2 População experimental.....	23
4.3 Manejo dos animais.....	24
4.4 Exames laboratoriais.....	24
4.4.1 Colheita das amostras.....	24
4.4.2 Hemograma e bioquímica clínica.....	25
4.4.3 Eletroforese.....	25
4.4.4 Teste de Elisa.....	26
4.5 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Resposta imune inespecífica.....	29
5.1.1 Hemograma e bioquímica clínica.....	29
5.1.2 Frações globulínicas.....	35
5.2 Resposta imune humoral.....	38
5.2.1 IgM.....	38
5.2.2 IgG.....	40
6 DISCUSSÃO.....	42
6.1 Resposta imune inespecífica.....	42
6.2 Resposta imune humoral.....	46
7 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Bovinos da raça Curraleiro. A) São João do Piauí - PI. B) Cavalcante - GO. C) Cocos - BA. D) Sucupira – TO.....	3
FIGURA 2	Esquematização da apresentação de antígenos solúveis a linfócitos B, capturados por DCs intermediado por células T. Adaptado de ABBAS, 2008.....	14
FIGURA 3	Local de confinamento dos bezerros estudados na Escola de Veterinária, UFG.....	22
FIGURA 4	Bezerros das raças Curraleiro e Nelore utilizados neste estudo. A)Curraleiro B)Nelore.....	23
FIGURA 5	Representação dos valores médios de leucócitos totais ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	30
FIGURA 6	Representação dos valores médios de segmentados neutrófilos ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	31
FIGURA 7	Representação dos valores médios de linfócitos ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	32
FIGURA 8	Representação dos valores médios de monócitos ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	33
FIGURA 9	Representação dos valores médios da fração alfa-1 globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	37
FIGURA 10	Representação dos valores médios da fração beta globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	37
FIGURA 11	Representação gráfica dos valores médios da fração gama globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	38
FIGURA 12	Representação dos valores médios para quantificação de IgM- <i>M. bovis</i> específica por meio do teste de ELISA.....	39

FIGURA 13	Representação dos valores médios de IgM- <i>M. bovis</i> específica dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	40
FIGURA 14	Representação dos valores médios de IgG- <i>M. bovis</i> específica dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação.....	41

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de leucócitos ( $/\mu\text{l}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	29
TABELA 2	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de bastonetes e segmentados neutrófilos dos bezerros Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	31
TABELA 3	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de linfócitos ( $/\mu\text{l}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	32
TABELA 4	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de monócitos ( $/\mu\text{l}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	33
TABELA 5	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) de proteínas totais, albumina e globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	34
TABELA 6	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) da relação albumina:globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	35
TABELA 7	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) das frações globulínicas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	36
TABELA 8	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) de densidade óptica de IgM <i>M. bovis</i> específicos dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	39
TABELA 9	Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) de densidade óptica de IgG- <i>M. bovis</i> específica dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009.....	41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\gamma\delta$	Gama-delta
BCG	Bacilo de Calmette e <i>Guérin</i>
BCR	Receptores de antígeno das células B
BoLA	Complexo antigênico de linfócito bovino
CMI	Imunidade mediada por células
DC	Célula dendrítica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HEV	Vênulas endoteliais altas
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
NK	Células <i>natural killer</i>
Nramp1	Proteína 1 de macrófagos associados a resistência natural
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	Derivado de proteína purificada de <i>Mycobacterium</i>
TCC	Teste cervical comparativo
TCD4	Linfócito T com marcador de superfície CD4
TCD8	Linfócito T com marcador de superfície CD8
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa

## RESUMO

A raça Curraleiro foi formada em regime de criação extensiva na região do cerrado, com mínimos cuidados sanitários e de alimentação, resultando em animais rústicos, que constituem um importante recurso genético para a pecuária brasileira. Com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre aspectos imunológicos dessa raça, foi realizado o estudo comparativo entre bovinos da raça Curraleiro e Nelore após vacinação com *Mycobacterium bovis* - BCG. Para tanto se quantificou a produção de anticorpos IgM e IgG específicos para *Mycobacterium bovis*, por meio do teste de ELISA indireto método *in house*. Utilizou-se 12 bezerros de propriedades do Estado de Goiás, seis de cada raça com idade aproximada de seis meses. Os bezerros de cada raça foram subdivididos em outros dois grupos, o grupo vacinado recebeu *Mycobacterium bovis* – BCG via intradérmica. Inicialmente os dados foram submetidos à estatística descritiva e posteriormente aos testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. Para o protocolo de avaliação realizaram-se os seguintes exames: hemograma, quantificação de proteína total, albumina, globulina, eletroforese das proteínas séricas, IgG e IgM *M. bovis* específicas. Agrupando os resultados de todas as colheitas, observou-se que os bezerros da raça Curraleiro quando comparados aos bezerros Nelore, apresentaram maiores contagem total de leucócitos, segmentados, linfócitos e monócitos; concentrações mais elevadas de proteínas e globulinas séricas; das frações alfa-1, beta e gama globulinas. Considerando especificamente a vacinação com *Mycobacterium bovis* - BCG, os bezerros Curraleiro produziram maiores quantidades de IgM e IgG *M. bovis* específicas quando comparados aos bezerros Nelore. Entre os grupos vacinados o que apresentou maiores valores foi o grupo Curraleiro vacinado, seguido pelo grupo Curraleiro controle, posteriormente grupo Nelore vacinado e por fim o grupo Nelore controle, com as menores concentrações. Conclui-se que bovinos da raça Curraleiro quando comparados aos da raça Nelore apresentam resposta imunológica inespecífica e específica humoral maiores, caracterizada por maior número de leucócitos e maiores concentrações de imunoglobulinas IgM e IgG – *M. bovis* específicas.

Palavras-chave: anticorpos, vacina BCG, Pé-Duro, raças locais.

## ABSTRACT

Curraleiro breed was formed in regime of extensive breeding on region of cerrado, with minimal attention to infectious diseases and alimentary, resulted in animals extremely rustic that composed an important genetic recourse for Brazilian livestock. In order to improve the understanding about immunological aspects this breed, a comparative study between Curraleiro and Nelore calves after immunization with BCG vaccine. Was realized the quantity of IgM and IgG antibodies specifics to *Mycobacterium bovis*, by indirect ELISA in house method. Was determined twelve young calves (six month of age) were used throughout the study. The animals were divided in two groups: six calves from Curraleiro breed and six calves from Nelore breed. Each group was further divided in: immunized group which received the BCG vaccine and a control which received the adjuvant. The data were submitted to descriptive statistics and then to the Kruskal Wallis and Mann-Whitney tests. It was realized hemogram, total protein, albumin, globulin eletroforesis of serological protein, ELISA for *M. bovis* IgG and IgM levels. The results were grouped and Curraleiro and Nelore calves were compared, the Curraleiro breed exhibited larger numbers of leucocytes, neutrophils, lymphocytes and monocytes; higher proteins and globulins levels; and higher concentration of alfa-1, beta and gama globins fraction. So, considered the vaccination to BCG, the Curraleiro calves were more levels in produce specifics *M. bovis* IgM and IgG. Between the immunized groups, Curraleiro group immunized presented better performance than Curraleiro control group, Nelore group immunized and lastly Nelore control group. Concluded that Curraleiro breed compared to Nelore breed exhibited unspecific and specific humoral immune response more productive qualified for bigger numbers of leucocytes and higher concentration of unspecific and specific immunoglobulin.

Keywords: antibodies, local breed, Pé-Duro, BCG vaccine.

## 1 INTRODUÇÃO

As raças bovinas trazidas da Península Ibérica deram início ao povoamento dos campos naturais do Brasil e adaptaram-se ao novo ambiente, formando grandes rebanhos e originando diversas raças locais ou naturalizadas, algumas das quais já geneticamente melhoradas. Dentre as raças locais encontra-se a raça Curraleiro, que se formou em regime de criação extensiva, com mínimos cuidados sanitários e de alimentação, resultando em animais extremamente rústicos, que constituem um importante patrimônio genético para a pecuária brasileira.

Nos dias de hoje, o Curraleiro encontra-se a ponto de ser totalmente absorvido por outras raças. A extinção de raças naturalizadas brasileiras irá representar perda irreparável para o país, pois com elas, irão desaparecer informações contidas na estrutura genética desses animais. Para evitar sua extinção, grupos de pesquisadores têm se empenhado em estabelecer programas de conservação destinados à proteção desse patrimônio genético.

Os séculos de seleção por que passaram provavelmente conferiram ao Curraleiro maior resistência a enfermidades endêmicas. Enfermidades essas, responsáveis por grandes perdas econômicas e de produtividade em regimes tradicionais de produção, que utilizam raças exóticas criadas em grande escala.

Apesar do conhecimento tradicional atribuir ao gado Curraleiro características de maior resistência quando comparado a outras raças bovinas, estudos sobre o sistema imunológico desses animais são escassos. Essas lacunas ficaram mais evidentes, após a publicação de resultados de investigações e descrição das características populacionais e epidemiológicas da raça. Neste contexto estudos que comprovem tal resistência devem ser realizados, de modo a demonstrar a importância da manutenção deste importante recurso genético animal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origem e histórico do gado Curraleiro

Na época da colonização, em meados do século XVI, iniciou-se a criação de gado no Brasil, a qual se revelou de grande importância para a colônia recém-descoberta. Os bovinos foram trazidos por colonizadores portugueses e espanhóis (VELLOSO, 1996). Estes bovinos pertenciam a três troncos: *Bos taurus ibericus*, *Bos taurus aquitanicus* e *Bos taurus batavicus* (ATHANASSOF, 1958). O gado conhecido no Piauí e Maranhão como Pé-duro e como Curraleiro em Goiás e Tocantins, provém da união das raças portuguesas Alentajana e Galega, com animais de origem espanhola pertencentes ao tronco *Bos taurus ibericus*, introduzidos a partir da bacia do Rio São Francisco (VIANA, 1927).

Essa foi a primeira raça efetivamente surgida no Brasil, resultante da miscigenação e adaptação aos diversos ecossistemas e, por ser um gado que habita o nosso país há mais de 400 anos, pode ser considerado um verdadeiro tesouro genético, uma vez apresenta características de adaptação e resistência às condições adversas do cerrado brasileiro. Adicionalmente, são animais dóceis, rústicos, resistentes a doenças e parasitas e, por isso, poderiam ocupar milhares de hectares de áreas desfavoráveis a outras raças, sem precisar de grandes investimentos por parte dos produtores. Essa e outras raças bovinas seculares, como Caracu, Mocho Nacional, Crioulo Lageano, Pantaneira e Junqueira, dentre outras, que encontram-se no Brasil desde a colonização. E em função disso, foram desenvolvendo ao longo dos séculos características de rusticidade e adaptabilidade muito importantes para programas de melhoramento genético e cruzamentos industriais com raças especializadas para criação em regiões tropicais, subtropicais e semi-áridas do Brasil e de outros países (MARIANTE & EGITO, 2002).

Na América Latina, o gado naturalizado foi à base da pecuária por quase cinco séculos, porém, nos dias de hoje encontra-se a ponto de ser totalmente absorvido por outras raças. Algumas populações vêm sendo cruzadas com linhagens exóticas sem nenhum plano sistemático de melhoramento, na

expectativa de que as raças introduzidas diluam problemas de produção que estão associados a outros entraves da pecuária, como sanidade e nutrição (CAMARGO, 1984; JULIANO, 2006).

Sobre a situação atual do gado Curraleiro, foram identificados e cadastrados rebanhos em cinco estados brasileiros: Goiás, Tocantins, Bahia, Pará e Piauí. Obtiveram-se informações adicionais que os estados do Maranhão, Paraíba e Minas Gerais ainda possuem rebanhos, mas estas ainda não foram confirmadas e quantificadas. O efetivo total identificado foi de 5.233 bovinos (FIORAVANTI, 2008).



FIGURA 1 – Bovinos da raça Curraleiro. A) São João do Piauí - PI. B) Cavalcante - GO. C) Cocos - BA. D) Sucupira - TO

Atualmente, encontram-se vulneráveis à extinção, apesar de serem animais que demonstram particularidades ímpares de uma raça local que vem sofrendo ao longo do tempo a ação da seleção natural, a ponto de apresentarem características específicas de tais condições, entre essas a rusticidade. Estas características são notáveis justificativas para manter este recurso genético

potencialmente importante, visto a possibilidade de que essas, puras ou em cruzamentos, se tornem mais produtivas do que as raças exóticas melhoradas, em determinadas condições de exploração, além de constituírem fonte de material genético capaz de melhorar a resistência de outras raças às condições hostis do ambiente (EGITO et al., 2002).

As mudanças recentes na pecuária brasileira e mundial apontam para um novo paradigma de criação, em que o uso de defensivos animais é limitado ao mínimo indispensável, senão completamente abolido. O propósito seria a produção de alimentos, tanto carne quanto leite, isentos de quaisquer resíduos químicos. A palavra de ordem hoje é a manutenção de animais sadios para que se possam utilizar as suas próprias defesas para o combate das diversas enfermidades que são comuns em rebanhos submetidos a manejos intensivos. O estudo do sistema imune dos ruminantes desempenha, assim, um papel chave neste cenário (GARCIA et al., 2004).

Há muito a ser investigado sobre a interação do sistema imunológico com processos fisiológicos, patológicos e epidemiológicos dos animais domésticos. Os componentes do sistema imune e suas funções na manutenção do estado de saúde dos animais podem ser investigados por meio de diferentes métodos diagnósticos (JULIANO, 2006).

## **2.2 Resistência dos bovinos às enfermidades**

A resistência a doenças é um atributo particularmente importante nos sistemas de produção da pecuária e a sanidade pode ser fator limitante na sustentabilidade desses sistemas. A possibilidade de aumentar a resistência genética a doenças em um rebanho é bastante viável aplicando-se técnicas simples, como a inclusão de raças naturalizadas nos programas de melhoramento genético (GIBSON, 2002; GIBSON & BISHOP, 2005).

O desenvolvimento de uma enfermidade é o resultado de interações entre o genótipo de um indivíduo e o meio ambiente. Para a seleção genética de indivíduos resistentes à determinada doença é necessário identificar os genes específicos relacionados a esta resistência ou os marcadores genéticos ligados a

mesma. Conseqüentemente o conhecimento do sistema imune é de fundamental importância para realização deste trabalho, sendo que os genes do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) parecem estar intimamente comprometidos nesta resistência, já tendo sido evidenciado em bovinos, seu envolvimento na resistência a carrapatos, parasitos intestinais e mastite (WARNER et al., 1987).

O complexo de histocompatibilidade maior (MHC) consiste de um grupo de genes que constituem o mais importante componente genético do sistema imune dos mamíferos. É de extrema importância no reconhecimento de antígeno e ativação da resposta imune a patógenos. O MHC atrai considerável atenção em decorrência da sua relação com doenças infecciosas, autoimunes e sua variabilidade genética. Para o gado leiteiro, este complexo refere-se como complexo antigênico de linfócito bovino (BoLA), organizado em três classes distintas (classe I, II e III), onde cada uma é dividida em regiões e subregiões, contendo genes e pseudogenes. Estudos recentes realizados com o objetivo de avaliar a interação entre resistência a doenças e o MHC demonstraram existir correlação significativa entre alelos da região DRB do gene de MHC e a resistência a doenças, como em vacas holandesas e a resistência a mastite (ANDERSSON & DAVIS, 1994; PASHMI et al., 2009).

DIETZ et al. (1997a e b) investigaram a associação de alelos DRB3.2 do BoLA e 20 variáveis imunológicas. Foi relatado significativa associação com 13 funções dos leucócitos, incluindo concentração de IgG2, IgM e níveis de complemento, e números de células mononuclear, sugerindo que o alelo DRB3.2 está associado a fatores envolvidos na função imune. Principalmente, na associação genética do gene BoLA-DRB3 com o desempenho do perfil imune e a resistência a mastite.

É evidente que a resistência a doenças infecciosas é geneticamente determinada e atualmente, o interesse na seleção para resistência a problemas de saúde na indústria leiteira, por exemplo, bem como a seleção para o melhoramento da saúde de todo o rebanho para os consumidores está internacionalmente aumentando a importância (STEAR et al., 2001). Mas desafortunadamente, a herança do perfil saudável pode ser lentamente transferida e com limitada quantidade de dados a progênie de animais mais resistentes a doenças, os quais atrasam o potencial para o melhoramento

genético por métodos tradicionais de seleção. Conseqüentemente, tem sido considerado interessante definir marcadores genéticos e imunológicos que poderiam ser usados na seleção para melhorar a resistência a doenças (PARK et al., 2004).

A comprovação da resistência dos animais a uma só doença, a princípio, parecia não estar relacionada à resistência a outras enfermidades. Contudo, a sinalização e ativação de algumas vias das células do hospedeiro podem ter similaridades relacionadas à sobrevivência ou não de patógenos intracelulares (ADAMS & TEMPLETON, 1998). Alguns estudos confirmaram a resistência genética de touros Black Angus, *in vitro* e *in vivo* quando desafiado pela *Brucella abortus*. Posteriormente este animal foi clonado e seu clone demonstrou ser resistente também a *Mycobacterium bovis* e *Salmonella Typhimurium* (WESTTHUSIN et al., 2007).

A associação entre resistência natural e proteína 1 dos macrófagos (*Nramp1*) foi observada na resistência ou suscetibilidade a *Mycobacterium bovis*. Foi relatada em bovinos a existência de polimorfismo de micro-satélites, afetando desta forma a expressão do gene *Nramp1* e também a replicação da *Brucella abortus* (ABLES et al., 2002). Estudos também mostraram que vacas resistentes à brucelose possuíam macrófagos significativamente mais ativos que aqueles de fêmeas suscetíveis. Em relação à tuberculose também existem relatos comprovando a resistência natural de alguns bovinos à doença (ADAMS & TEMPLETON, 1998).

### **2.3 Tuberculose bovina**

A tuberculose bovina é causada pelo *M.bovis* e possui distribuição mundial, concentrando-se principalmente em países em desenvolvimento e em criações intensivas, como em bovinos leiteiros. A tuberculose bovina concentra-se principalmente na América do Sul, que também detém a maior população bovina (KLEEBERG, 1984; ROXO, 1996).

A principal via de infecção dos bovinos adultos é a inalação de partículas de aerossol, sendo a via digestiva o principal mecanismo de

contaminação dos bezerros (PALMER & WATERS, 2006). No entanto, o processo da exposição ao bacilo e o desenvolvimento da doença não estão totalmente esclarecidos (POLLOCK et al., 2006). A tuberculose bovina é uma enfermidade crônica caracterizada por lesões granulomatosas, associadas principalmente ao trato respiratório e aos linfonodos (NEILL et al., 1994).

Como a via de infecção mais comum é o trato respiratório, o pulmão é o órgão primariamente atingido, assim como os linfonodos regionais. Na primo infecção pulmonar os bacilos se alojam no tecido, promovendo uma reação inflamatória, denominada pneumonia. A doença se desenvolve nos pulmões, formando nódulos caseosos, de tamanhos variados, podendo atingir todo o parênquima e formando lesões cavitárias. Em animais imunossuprimidos é mais freqüente a disseminação do agente pelo parênquima pulmonar e, pela via hematogena, podendo alcançar os linfonodos regionais, formando metástases em outros órgãos. No foco inicial da infecção ocorre infiltração celular, necrose de caseificação e circunscrição da lesão, que pode evoluir para resolução e calcificação. Quando a penetração do bacilo é pela via digestiva, a lesão inicial se dá no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. Entretanto, pode atingir praticamente todos os órgãos quando ocorre a generalização do processo (PRITCHARD, 1988; O'REILLY & DABORN, 1995).

Após a infecção por *M. bovis* observa-se na lesão infiltração de células mononucleares, incluindo macrófagos e linfócitos (CASSIDY et al., 2001). Os macrófagos são as primeiras células que abrigam o *M. bovis* e onde ocorre a proliferação intracelular, sendo seguido pela deposição do bacilo no parênquima pulmonar, posteriormente outras células do sistema imune inato e da resposta adaptativa são envolvidas (NEILL et al., 2001).

Considerando a importância que a pecuária assume na economia nacional, os dados referentes à freqüência da tuberculose bovina nos rebanhos brasileiros não permitem uma visão exata sobre a verdadeira extensão do problema. Mas estima-se que a tuberculose atinja cerca de 10% das vacas leiteiras e 20% das propriedades do rebanho leiteiro. Acredita-se que os animais infectados perdem de 10% a 25% de sua eficiência produtiva (ABRAHÃO et al., 2005). Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e

Tuberculose (PNCEBT), com o objetivo de diminuir os índices de incidência e prevalência destas doenças. O controle destas enfermidades, não só minimizaria os prejuízos econômicos, mas ofereceria garantias de inocuidade dos alimentos, tanto carne como leite e derivados, ao consumo interno e aumentaria a competitividade dos nossos produtos no mercado internacional (ROXO, 2004).

Testes de tuberculinização têm sido utilizados para diagnóstico de tuberculose em bovinos há mais de um século e avaliam respostas de hipersensibilidade do tipo tardia, 72 horas após uma injeção intradérmica de tuberculina (PPD - derivado protéico purificado de *Mycobacterium*). O MAPA preconiza duas modalidades de testes: o intra-dérmico simples, que utiliza apenas tuberculina bovina e o teste intra-dérmico comparado, que utiliza tuberculina bovina e aviária. A tuberculinização comparada permite reduzir diagnósticos falso-positivos por reações desencadeadas por agentes do complexo MAIS (*Mycobacterium avium*, *M. intracelulareae*, *M. scrofulaceum*), que não são patogênicos para bovinos, porém são capazes de desencadear reações positivas (MONAGHAN et al., 1994, MAPA, 2008).

Além do diagnóstico de tuberculose poder ser feito *in vivo* pelo exame clínico e pelo teste tuberculínico intradérmico; pode também ser realizado *post-mortem* por exames histopatológico e bacteriológico, que incluem isolamento do agente por técnicas padrões e avançadas (HAAGSMA, 1995).

## 2.4 Resposta imune

A resposta imune é elaborada a partir de tecidos, células e mediadores químicos especializados, que formam o sistema imune. A eficiência funcional desse sistema depende da capacidade do mesmo em reconhecer antígenos endógenos e exógenos de ação deletéria ao organismo (NOSSAL, 1993).

Definem-se dois tipos de resposta imune: a inata e a adquirida ou adaptativa. A resposta inata é inespecífica, realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos, que realizam a identificação da partícula antigênica, a fagocitose e desencadeiam a liberação de citocinas que contribuem com a instalação do processo inflamatório e a intensificação da resposta imune. A

resposta imune adaptativa, por sua vez, apresenta especificidade na identificação de antígenos, originam respostas menos danosas e geram memória imunológica, sendo os linfócitos as principais células da resposta imune específica (ABBAS et al., 2008).

A resposta imune ao *M. bovis* é uma complexa interação entre patógeno-hospedeiro e o conhecimento detalhado dessa interação, nos bovinos naturalmente infectados, é limitado. Estudos da resposta imune têm sido realizados em modelos experimentais (BOOM, 1996; POLLOCK et al., 2001).

Estudos imunohistológicos de lesões granulomatosas em bovinos, causados pela infecção experimental de *M. bovis*, indicam que as células T são as primeiras células envolvidas nessa reação (CASSIDY et al., 2001). POLLOCK et al. (2001) afirmaram que a resposta imune mediada por células é importante tanto nos animais natural quanto nos experimentalmente infectados.

Apesar do predomínio da resposta imune celular, existem pesquisas importantes quanto à participação da resposta imune humoral (FIFIS et al., 1994; LYASHCHENKO et al., 1998). Segundo LYASHCHENKO et al. (1998), a resposta imune humoral de bovinos experimentalmente infectados envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos pelos animais em diferentes estágios da doença.

Nesse sentido, tem sido postulado que durante os estágios iniciais de infecções micobacterianas, há a predominância da resposta imune mediada por células; no entanto, com o progresso da doença pode ser observada uma alteração da relação de células T *helper* tipo 1 e 2 (Th1/Th2), que se associa a uma fase onde a produção de anticorpos é predominante (RITACCO et al., 1991).

Comumente, como em outras doenças micobacterianas, no início da resposta imune em bovinos tuberculosos há a dominância da imunidade mediada por células (CMI). Animais desenvolvendo resposta de células T podem ser identificados usando várias técnicas. Estes métodos incluem mensuração da reação de hipersensibilidade do tipo tardia, quantificação da proliferação de linfócitos *in vitro* e detecção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) liberado por células T sensibilizadas *in vitro*. Contudo, alguns animais infectados podem ter uma resposta de anticorpos na ausência de resposta mediada por células, particularmente quando a carga bacteriana é alta. Inúmeros testes de ELISA têm sido descritos baseados em antígenos do complexo *M. bovis*, como derivado de

proteína purificado (PPD) e antígenos fosfatídeos. Todos estes ensaios tiveram sucesso na detecção de anticorpos circulantes para micobactérias, mas são considerados carentes em especificidade. Esta descoberta estimula pesquisas para identificação de proteínas associadas com *M. bovis* melhorando ensaios específicos (McNAIR et al., 2001).

#### 2.4.1 Resposta imune inata ao *M. bovis*

O bacilo *M. bovis* entra e ultrapassa as barreiras físicas do trato respiratório, onde os macrófagos alveolares fagocitam estas micobactérias e geralmente as destroem, dependendo da capacidade microbicida intrínseca dos fagócitos do hospedeiro e ainda dos fatores de virulência dos bacilos ingeridos. As micobactérias que escapam da destruição intracelular se multiplicarão, causando a ruptura dos macrófagos. Esse evento culminará com a infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar e crescimento de bacilos nos monócitos (FLYNN et al., 2001; VAN CREVEL et al., 2002).

Os macrófagos e células dendríticas são células envolvidas na resposta imune inata à micobactéria. Essas são as células responsáveis pela apresentação do antígeno e assim para o início da imunidade adaptativa. As primeiras moléculas de MHC II apresentam a proteína micobacteriana para a célula TCD4<sup>+</sup> antígeno específica. A molécula de MHC I apresenta para os linfócitos TCD8<sup>+</sup> antígeno específica, para então se iniciar a resposta imune adaptativa (MAZZACCARO et al., 1996; GELUK et al., 2000; CHO et al., 2000).

O *Mycobacterium sp.* caracteriza-se como um patógeno bacteriano intracelular, sendo assim desenvolve uma resposta imune denominada de hipersensibilidade tardia ou hipersensibilidade do tipo IV (DANNENBERG, 1993).

Na interação dos macrófagos com a bactéria estes se ativam produzindo quimiocinas e citocinas, as quais têm potencial para controlar infecções micobacterianas. No desenvolvimento dessa interação o bacilo pode ser destruído e eliminado do hospedeiro ou ainda tornar-se quiescente. Nesse caso, poderá levar ao desenvolvimento de tuberculose ativa ou ser reativado da dormência em estágios futuros oportunos (WELSH et al., 2005).

A função do macrófago na tuberculose é complexa, pois, ao mesmo tempo em que essas células são as preferidas pelas micobactérias intracelulares, eles também são as células efetoras no controle e destruição desses patógenos (POLLOCK & NEILL, 2002).

Segundo ARMSTRONG & HART (1975), o vacúolo fagocítico contendo micobactéria metabolicamente ativa escapa da fusão com o lisossomo, sendo essa característica um mecanismo de evasão e sobrevivência desse organismo. O *M. bovis* pode crescer relativamente livre dentro do macrófago bovino. Os autores acrescentam ainda que a interação macrófago-micobactéria define os eventos subseqüentes da resposta ao *M. bovis*.

Apesar do papel fundamental dos macrófagos, outras células, tais como as *natural killer* e neutrófilos, podem estar envolvidas na resposta imune, principalmente na fase inicial da infecção por *M. bovis* (POLLOCK & NEILL, 2002).

#### 2.4.2 Resposta imune adaptativa

##### a) Resposta imune celular ao *M. bovis*

A resposta imune na tuberculose bovina é mediada por células e desencadeia a formação de granuloma, considerado um indicativo de doença (WANGOO et al., 2005).

O mecanismo que desencadeia a formação do granuloma ocorre da seguinte forma: na resposta imune ao *M. bovis*, após a exposição ao antígeno, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pré-estocado, liberado pelos macrófagos, recruta neutrófilos e monócitos circulantes. Ao mesmo tempo, o IFN- $\gamma$  produzido por células NK e T $\gamma\delta$ , ativam macrófagos e células dendríticas. Essas células liberam quimiocinas e mais TNF- $\alpha$ , os quais alteram a microcirculação local e facilitam o tráfego celular para o tecido. Após um período ainda não determinado as células dendríticas carregadas com antígenos migram para o linfonodo iniciando a resposta linfocítica. Essas células dendríticas produzem interleucina-12 (IL-12) e apresentam o antígeno para as células TCD4<sup>+</sup> *naive*. Sob a influência da IL-12 as TCD4<sup>+</sup> *naive* diferenciam-se em Th1. Estas por sua vez, secretam IL-

2, que leva a expansão clonal da célula Th1 antígeno específica. Cerca de 10 a 20 dias após a exposição ao antígeno do *M. bovis* as células TCD4<sup>+</sup> ativadas vão para o local onde ocorreu a alteração da microcirculação. Caso a fonte do antígeno não tenha sido erradicada, a inflamação persiste. A interação entre Th1CD4<sup>+</sup> e macrófagos ativados leva à produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que resulta na maturação de mais macrófagos, formando células gigantes multinucleadas (macrófagos epitelióides) caracterizando-se em uma lesão endurecida e tumefeita, o granuloma ou tubérculo (WANGOO et al., 2005).

O influxo de monócito/macrófago e células T está associado ao mecanismo de morte ou inibição da micobactéria. Em muitos casos a progressão da doença é retida neste estágio, no entanto, o bacilo presente no tubérculo pode não ser completamente eliminado (STEAD, 1967; VAN CREVEL et al., 2002).

Quando a formação do granuloma progride, o seu centro torna-se necrótico, devido à falta de irrigação sanguínea e diminuição da oxigenação. Esse processo é classificado como hipersensibilidade do tipo tardia, sendo associado ao início efetivo no controle do crescimento da micobactéria (DANNENBERG, 1991).

#### b) Resposta imune humoral

Os linfócitos B, os plasmócitos e os anticorpos são à base da resposta imune humoral. Algumas células B se transformam em células de memória, que permanecem na circulação e disponíveis nos linfonodos drenantes associados às células dendríticas foliculares garantindo resposta rápida e eficaz contra futuras exposições àquele antígeno (STEVENS & LOWE, 2001; TIZARD, 2002; JANEWAY et al., 2007).

As células B também desempenham importante função de APCs. Possuem receptores específicos, imunoglobulinas de membrana (IgM e IgD) também chamadas de receptores de antígeno das células B (BCR) que podem se ligar a antígenos processados previamente por outras células apresentadoras de antígeno da resposta imune inata. Depois disso, as células B endocitam e processam antígenos antes de apresentá-los, em associação com moléculas de MHC, para as células T (TIZARD, 2002; SUETAKE et al., 2006). A importância das células B como células processadoras de antígenos pode ser confirmada pela

resposta prejudicada das células T em animais que possuem depleção de células B (TIZARD, 2002).

O início de uma resposta imune humoral envolve o reconhecimento de antígenos por células B via imunoglobulina de superfície. Estudos anatômicos indicam que proteínas nos linfonodos podem não ter acesso ao folículo onde residem as células B *naive*. Assim, não está claro como as células B reconhecem antígenos drenados para os linfonodos. Estudos utilizando antígeno fluorescente e peptídeo derivado do complexo MHC II demonstraram que células B antígeno específicas residem nos folículos de reconhecimento de antígeno, a primeira região próxima ao seio subcapsular onde a linfa entra para o linfonodo. O reconhecimento de antígeno, apresentação e subsequente ativação de células T dependentes não requerem a migração de células B através da área de células T ou exposição a células dendríticas. Estes resultados indicam que a resposta humoral é iniciada com antígenos solúveis diretamente no seio subcapsular do linfonodo para que as células B tornem-se antígeno-específicas na base do folículo (PAPE et al., 2007).

Células B *naive* entram nos linfonodos via sangue através de vênulas endoteliais altas (HEV), migram pela área de células T e gastam cerca de 24 horas nos folículos antes de saírem pelos linfáticos eferente e retornarem a circulação (GOODNOW, 1997). Quando encontram um antígeno, as células B expressando moléculas Ig específicas aumentam a expressão de receptor de quimiocina CCR7 e migram para a borda entre o folículo e área de células T onde elas apresentam peptídeos derivados de antígenos contidos nas moléculas MHC II antígeno específicas a células Th CD4+ (GARSIDE et al., 1998; OKADA et al., 2005;). As células B antígeno específicas recebem sinais das células Th, proliferam e submetem-se a troca de isótopo (JACOB et al., 1991; PAPE et al., 2003). Algumas progênies ativadas tornam-se plasmócitos secretores de anticorpos extrafolicular enquanto outros entram nos centros germinativos, onde elas sofrem mutação somática para gerarem células B de alta afinidade e plasmócitos de vida longa. (KELSOE, 1996; VINUESA et al., 2005).

Trabalhos recentes esclarecem o processo anatômico que leva o reconhecimento do peptídeo:complexo MHC II e ativação de células Th no linfonodo. Proteínas antigênicas de microorganismos ou vacinas que estão

presentes nos tecidos subcutâneos seguem pelos linfáticos aferentes dentro dos seios subcapsular sendo drenados para os linfonodos (ITANO & JENKINS, 2003; CATRON et al., 2004). Experimentos com injeção de antígenos microscópicos demonstraram que antígenos solúveis não infiltram livremente para os seios subcapsular pela área de células T e folículos (GRETZ et al., 1997, GRETZ et al., 2000). Os tubos condutores formam um complexo comunicante que se conectam fisicamente no espaço em torno do HEV para os seios. Células dendríticas (DCs) residentes nos linfonodos interagem fisicamente nos condutos e apresentam antígenos solúveis (BAJENOFF et al., 2003; SIXT et al., 2005), as DCs nos tecidos subcutâneos capturam os antígenos, migram para os seios subcapsular e fagocitam-no até alcançar a área de células T onde ocorre a apresentação do antígeno as células T, conforme esquematizado na Figura 2 (CAVANAGH & VON ANDRIAN, 2002; ITANO & JENKINS, 2003).

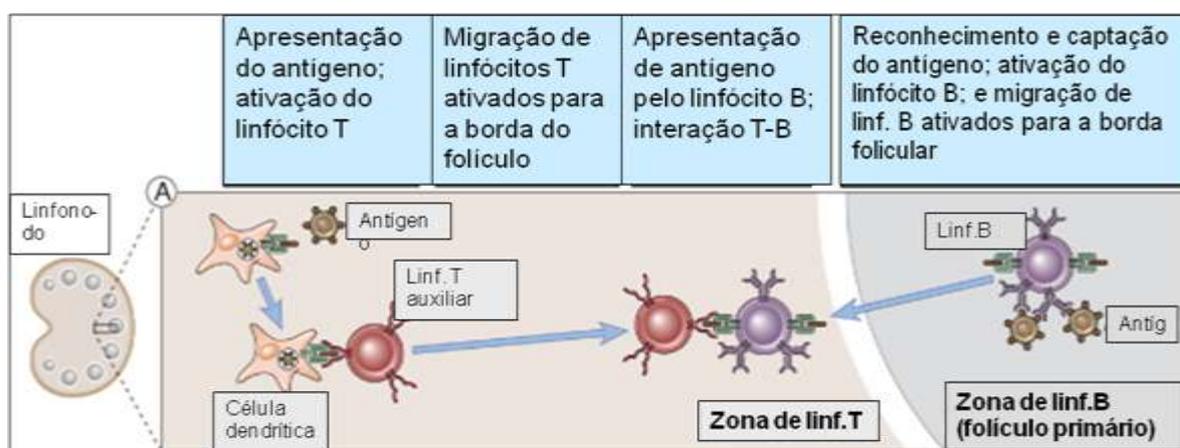


FIGURA 2 – Esquematização da apresentação de antígenos solúveis a linfócitos B, capturados por DCs intermediado por células T. Adaptado de ABBAS, 2008.

Não está claro como as células B adquirem seus antígenos cognatos. Os condutos comunicantes são relativamente poucos nos folículos comparados com a área de células T. Antígenos solúveis escapando pelos condutos nos folículos não foram observados. Assim, as restrições impostas aos antígenos solúveis em se comunicarem com os condutos demonstram ser esta uma barreira

significante a apresentação de antígenos para a grande maioria de células B *naïve*, que residem nos folículos (PAPE et al., 2007).

BERGTOLD et al. (2005) e DELAMARRE et al. (2005) relatam um mecanismo indireto em que as células B adquirem antígenos de DCs que capturam antígenos via receptor Fc inibitório FcγRIIB e os mantêm em uma forma não processada na superfície da célula. BALAZS et al. (2002), MACPHERSON & UHR (2004) e QI et al. (2006) descreveram interações entre DCs e células B e demonstrando que as DCs podem regular a resposta de células B tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, segundo QI et al. (2006), quando células B entram nos linfonodos e migram pela área de células T, elas podem encontrar DCs residentes que capturaram antígenos solúveis dos condutos ou DCs migrantes que capturaram antígenos em outros tecidos. Depois do reconhecimento de antígenos não processados pelas DCs, células B migrantes da área de células T diretamente para a borda T-B recebem células Th. Para MARTINEZ-POMARES et al. (1996) e BERNEY et al. (1999), alternativamente, algumas DCs migram para dentro dos folículos de células B e, podem potencialmente carrear antígenos para células B antígenos específicas residentes nos folículos

Outra possibilidade é que células B antígeno-específicas entrem no linfonodo drenadas pelo sangue e capturem antígenos solúveis diretamente quando passam através do espaço perivenular das HEV. Se este for o mecanismo exclusivo pelo qual antígenos são capturados por células B, então células B residentes nos folículos por todo o tempo nunca poderiam capturar antígenos. Alternativamente, peptídeos de antígenos podem escapar dos seios subcapsular ou condutos, é aceitável que células B antígeno-específicas podem capturá-los diretamente enquanto residem nos folículos. Embora antígenos solúveis não tenham sido detectados fora dos condutos, microscópicos espaços (0,1 – 1 mm) podem ser detectados nos seios subcapsular (FARR et al., 1980; VAN EWIJK et al., 1988). Assim, é possível que pequenas porções de antígenos não detectados por microscopia, escapam por estes espaços e alcançam as células B antígeno-específicas nos folículos (PAPE et al., 2007).

### c) Imunoglobulinas

As moléculas de imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de aproximadamente 160kDa, também chamadas de anticorpos (TIZARD, 2002). São proteínas da fração de gamaglobulinas, sintetizadas por linfócitos B, sendo seus BCRs solúveis, que possuem capacidade de reconhecer, precipitar ou neutralizar microorganismos invasores ou proteínas estranhas (STEVENS & LOWE, 2001). De acordo com TIZARD (2002), existem cinco classes diferentes de Ig e BCR, os quais diferem quanto ao uso das cadeias pesadas, sendo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Quando estimuladas por um antígeno, as células B se dividem e se diferenciam em plasmócitos, secretando altas concentrações de anticorpos. A ligação dos anticorpos ao patógeno faz com que o mesmo seja neutralizado e, em seguida, lisado por enzimas do sistema complemento ou por fagócitos (JANEWAY et al., 2007; ABBAS et al., 2008).

Nos bovinos, estão identificadas e caracterizadas quatro frações de imunoglobulinas : IgG, IgM, IgA e IgE. (BUTLER, 1983; COLLARD et al. 1984). As imunoglobulinas IgG podem ser divididas em duas subclasses, IgG1 e IgG2. As IgG1 são seletivamente transportadas pela circulação para ser secretada via láctea, constitui a principal imunoglobulina para a imunização passiva de bezerros, sendo também responsável pela fixação de complemento e sensibiliza a pele de bovinos. As IgG2 aparentemente são mais homogêneas que IgG1 e ocorrem em altas concentrações no soro bovino. IgM está presente no soro, colostro e leite e é importante na resposta imune primária, fixação de complemento e como um aglutinador de anticorpos no soro. A IgA bovina é secretada no leite e colostro. As imunoglobulinas, quando separadas eletroforéticamente, encontram-se distribuídas, principalmente, nas frações beta e gama globulinas do soro sangüíneo normal (BUTLER, 1969).

Conhecendo-se as concentrações das proteínas séricas totais e da albumina, pode-se determinar, por diferença, o valor absoluto das globulinas. Pode-se ainda, estabelecer a relação albumina:globulina (SEVELIUS & ANDERSSON, 1995). A determinação das concentrações séricas de proteínas vem se tornando um procedimento valioso para o entendimento dos processos fisiopatológicos, sendo utilizada em animais sadios e doentes. Pesquisas recentes

têm evidenciado que a qualificação e a quantificação de proteínas séricas podem subsidiar o diagnóstico e trazer valiosas informações prognósticas e de monitoramento de doenças (ECKERSALL, 2000).

A eletroforese em gel de agarose tem sido utilizada amplamente em laboratórios de bioquímica clínica. Trata-se de uma técnica fundamentada na migração de partículas protéicas, eletricamente carregadas, em um campo elétrico e, no caso de soro sanguíneo, possibilita o fracionamento eletroforético de proteínas séricas em suas diferentes frações (KANEKO et al. 1997).

As globulinas, geralmente, são separadas eletroforéticamente nas frações alfa, beta e gama, as quais contêm sub-frações com padrões de migração eletroforética similares. A concentração sérica de cada fração é determinada e comparada com os valores de referência de cada espécie. O eletroforetograma aporta informações sobre elevações e decréscimos nas concentrações séricas das diferentes frações protéicas. Alterações nos padrões das frações protéicas não são características de uma doença em particular, mas podem trazer importantes informações diagnósticas, quando usados junto com outros achados clínicos e laboratoriais (FELDMAN et al. 2000)

Assim como a avaliação das frações globulínicas auxiliam o diagnóstico clínico, o conhecimento das imunoglobulinas de animais domésticos permitiu o desenvolvimento de testes sorológicos, como o teste de ELISA indireto, os quais se tornaram amplamente usados para diagnósticos e monitoramento de doenças infecciosas (CADMAN et al. 1994).

#### d) Resposta imune humoral ao *M. bovis*

FIFIS et al. (1994) caracterizou a resposta imune humoral ao agente da tuberculose bovina como lenta ou ausente no primeiro momento do período da infecção, mas aumentando substancialmente em um segundo momento, meses após a infecção. Ocorrem variações na intensidade da produção de anticorpos considerando as diferentes proteínas antigênicas do *M. bovis* utilizadas para o desafio e as características individuais do sistema imunológico dos animais avaliados, em relação à susceptibilidade e resistência ao patógeno. Esta variação de resistência também foi verificada em estudos realizados por WELSH et al.

(2005), em que o reconhecimento do antígeno é heterogêneo de animal para animal. A caracterização da resposta imune humoral em bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis*, intranasalmente ou por contato direto com bovinos tuberculosos, identificaram seis antígenos que foram reconhecidos por anticorpos séricos IgG. Análises posteriores do reconhecimento de soro individual revelaram uma variação na resposta de anticorpo nos diferentes animais.

Estudos sobre a resposta imune a tuberculose sugerem uma troca de dominância de células T *helper* tipo 1 (Th1) por resposta imune Th2, associado com a supressão da imunidade mediada por células (CMI) e aumento da resposta humoral a medida que a doença progride. Em estudo com hospedeiros naturais da doença foi investigado o balanço do desenvolvimento da resposta imune em bovinos infectados por *M. bovis* com a respectiva patogênese. Análise de citocinas de clones de células TCD4 derivadas de animais infectados por *M. bovis* indicam que houve relacionamento entre o aumento da patogênese e uma elevada proporção de clones Th0 [interleucina-4-positivo / interferon- $\gamma$ -positivo (IL-4+ / IFN- $\gamma$ +)] por clones Th1 (IFN- $\gamma$ +). Todos os animais desenvolveram forte resposta antimicrobiana CMI, mas a depressão da resposta celular foi evidente com a progressão da doença. Além disso, uma forte indução imune Th0, *in vitro* deprime respostas CMI, elevados níveis de expressão de IL-10 e aumento da resposta humoral foram também associados com o aumento da enfermidade. Na doença subclínica, no entanto, uma forte indução imune Th1 foi mantida e a resposta humoral anti-*M. bovis* não se desenvolveu. Isto foi observado também no nível de imunoglobulinas isotipo G1 (IgG1) anti-*M. bovis* correlacionado com os escores patológicos, enquanto que a resposta CMI não teve relação com o desenvolvimento da patologia. Então, o desenvolvimento e manutenção da resposta Th1 IFN- $\gamma$  está associado com o maior controle da infecção por *M. bovis*. Animais apresentando resposta imune Th0 para Th1 desenvolvem mais extensamente a patologia e são menos identificados em testes de diagnóstico baseado em CMI, pois desenvolvem melhor resposta humoral IgG1 (WELSH et al. 2005).

Quanto ao tempo de produção dos anticorpos estudos recentes realizados com o objetivo de padronizar testes de diagnóstico utilizando a

produção de anticorpos IgM e IgG específicos, buscando diagnosticar o mais precocemente a infecção por *M. bovis*. Foi possível o estabelecimento do diagnóstico em quatro semanas, quantificando anticorpos (IgM) específicos para *M. bovis* em bovinos experimentalmente infectados (WATERS et al., 2006).

Os testes para detecção de anticorpos específicos para a tuberculose são semelhantes para os animais e os humanos (FIFIS et al., 1994). Especialmente para bovinos, a inclusão de antígenos soro dominantes como o *M. bovis* protein - MPB70 e MPB83 têm aumentado a especificidade, mas não resulta em maior sensibilidade. Estudos realizados por THOM et al. (2004) mostraram que a resposta dos animais anérgicos é maior em relação aos anticorpos específicos do que pelo teste intradérmico. Esse aumento é correlacionado com a severidade da doença, sendo que animais com a doença mais generalizada apresentam maior título de anticorpos (LYASHCHENKO et al., 2004).

Vários estudos demonstraram que o monitoramento da cinética de produção de anticorpos séricos para múltiplos antígenos micobacterianos é útil para a caracterização da progressão da doença, na eficácia do tratamento e são ferramentas para o diagnóstico de infecções por *M. bovis* e *M. tuberculosis* em várias espécies (WATERS et al. 2002; WATERS et al. 2004; WATERS et al. 2005; WATERS et al. 2006; LYASHCHENKO et al. 2006; NOL et al. 2009).

O principal teste de diagnóstico para tuberculose nos animais de rebanho e silvestres é o teste intradérmico de tuberculina. Avanços recentes permitiram a incorporação de ensaios baseados em amostras sanguíneas como método de diagnóstico. O uso de antígenos definidos e específicos permite melhor especificidade em ensaios mediados por células e avanços em testes de anticorpos para tuberculose, sendo potenciais métodos de diagnóstico para animais silvestres em países que ainda não erradicaram a tuberculose, principalmente por sua manutenção em reservatórios silvestres. Um workshop de *M. bovis*, no ano 2000, em uma conferência de imunodiagnóstico concluiu que testes baseados em IFN- $\gamma$  *in vitro* e testes baseados em anticorpos aprimorando a especificidade de antígenos devem ser avaliados para uso em campanhas de erradicação da tuberculose. Testes baseados em anticorpos têm sido aplicados em programas de vigilância para tuberculose em cervídeos silvestres em Michigan (PALMER & WATERS, 2006).

Os testes para detecção de anticorpos são simples e não onerosos, oferecendo uma alternativa para detectar animais que foram negativos ao TTI e ao IFN- $\gamma$ . Conseqüentemente, os países em desenvolvimento podem adotar os testes sorológicos nos programas de erradicação da tuberculose como uma alternativa barata para detecção e remoção de animais em estados avançados da doença de seus rebanhos (POLLOCK et al., 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Comparar a resposta imune inespecífica de bezerros das raças Curraleiro e Nelore, bem como a resposta humoral específica vacinados com *Mycobacterium bovis* – BCG.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização do estudo

O estudo foi desenvolvido na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG) em Goiânia. Os animais foram alojados em uma área total de 123m<sup>2</sup>, dessa área 38m<sup>2</sup> das laterais são protegidas por alvenaria e o restante cercado por grade. O alojamento foi dividido em dois piquetes de 54m<sup>2</sup>, um para cada raça, contendo um corredor central de 15m<sup>2</sup> com piso de concreto (Figura 3). Os animais foram alimentados com ração para bezerros (Bezerro B1, Boi Forte, Goiânia) na quantidade de 1% do peso vivo e cana triturada na quantidade de 6% do peso vivo, disponíveis em período integral.

Os exames laboratoriais para avaliação clínica dos animais, hemograma, bioquímica sérica e eletroforese, foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica da Pós Graduação na EV/UFG. Os testes para quantificação de IgM e IgG foram realizados no Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás, protocolo 020/2008, portanto foram seguidas as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).



FIGURA 3 – Local de alojamento dos bezerros do estudo na Escola de Veterinária, UFG

## 4.2 População experimental

Os animais foram comprados de propriedades rurais do Estado de Goiás. Foram adquiridos bovinos com idades de aproximadamente cinco meses de idade que constituíram dois grupos experimentais: GC – 6 bezerros da raça Curraleiro e GN – 6 bezerros da raça Nelore (Figura 4). Estes dois grupos foram subdivididos em dois, sendo que três bezerros de cada raça constituíram o grupo vacinado (GV) e os demais o grupo controle (GC). Os grupos experimentais ficaram distribuídos do seguinte modo:

- GCV – 3 bezerros Curraleiro vacinados com BCG
- GCC – 3 bezerros Curraleiro inoculados com adjuvante
- GNV – 3 bezerros Nelores vacinados com BCG
- GNC – 3 bezerros Nelores inoculados com adjuvante.



FIGURA 4 - Bezerros das raças Curraleiro e Nelore utilizados neste estudo. A) Curraleiro.  
B) Nelore

### 4.3 Manejo dos animais

Assim que os bezerros chegaram a EV/UFG, foram tratados com endoparasiticida (IVOTAN® LA - Intervet, Fortaleza, Ceará) e submetidos a um período de adaptação ao novo ambiente e alimentação, de aproximadamente 30 dias. Os bezerros foram avaliados por meio de exames clínicos e laboratoriais (hemograma e testes bioquímicos), na fase de adaptação semanalmente e após o início do experimento.

A fase experimental teve início com os bezerros apresentando aproximadamente seis meses. O momento 0, ocorreu quando os animais foram vacinados, destes foram sorteados aleatoriamente para constituírem o grupos experimentais de cada raça. Os grupos vacinados receberam 500µl da vacina *Mycobacterium bovis* – BCG cepa Moreau via intradérmica, para desencadear o estímulo à resposta imune frente ao *Mycobacterium bovis*. Os animais dos grupos controle receberam 500µl de glicerina autoclavada em solução salina (volumes iguais).

Para que não houvesse nenhum tipo de interferência de outros microorganismos na resposta imune à vacina da tuberculose não foi administrada durante a fase experimental nenhuma outra vacina. Após o término do estudo os bezerros receberam vacina contra aftosa e clostridiose.

Todos os animais foram submetidos ao teste cervical comparativo (TCC) de acordo com o artigo 32 do regulamento técnico do Programa Nacional de Controle da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) do MAPA (BRASIL, 2001) que define o diagnóstico indireto confirmatório da tuberculose bovina. Os bezerros em estudo foram negativos para *M. bovis* antes do início do experimento.

### 4.4 Exames laboratoriais

#### 4.4.1 Colheita das amostras

Com o intuito de obter estimativa mais confiável do leucograma dos animais em estudo, durante o período de adaptação realizou-se quatro

hemogramas ao longo das semanas anteriores ao início do experimento. As médias das quatro colheitas foram utilizadas como valor basal.

Durante a fase experimental foram realizadas colheitas de amostra de sangue nos seguintes dias: imediatamente antes da vacinação e após 24 horas, aos sete, 15, 30 e 60 dias.

O sangue foi colhido por venopunção da jugular. Para o hemograma utilizou-se tubo de vácuo com EDTA e para a obtenção do soro colheu-se 10 ml em tubo de vácuo sem anticoagulante. As amostras sem anticoagulante, após a retração do coágulo foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 6 min. Alíquotas deste soro foram separadas e utilizadas para a realização imediata das provas bioquímicas e congeladas à - 20°C para a posterior realização da eletroforese e do teste de ELISA indireto.

#### 4.4.2 Hemograma e bioquímica clínica

A contagem das células sanguíneas foi determinada pelo método automático utilizando-se o aparelho BC-2800VET (*Animal Blood Conte* – Horiba ABX – São Paulo, SP), adaptado para a leitura da espécie bovina.

A proteína e albumina séricas foram determinadas utilizando reagentes comerciais padronizados (Labtest® - Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, MG), em temperatura de 37° C, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro digital (Coleman 35D®, Equipamentos para Laboratórios Comércio e Importação Ltda., Santo André, SP). As proteínas totais séricas foram quantificadas pelo método colorimétrico de ponto final, por reação com o biureto. A albumina foi quantificada pelo método colorimétrico, por reação com o verde de bromocresol.

Ao longo do período de adaptação e experimental, para a verificação da higidez dos animais, integridade morfológica e funcional do fígado e rim, realizou-se as seguintes provas de bioquímica clínica: aspartato-aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina.

#### 4.4.3 Eletroforese das proteínas séricas

A técnica de eletroforese realizada foi em gel de agarose, utilizando reagentes e gel comercial (Celmigel – CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios

Modernos, Barueri, SP). A corrida feita com tampão veronal/EDTA 0,05M em pH 9,5 e os géis corados pelo negro de amido a 0,2%, descorados pelo ácido acético a 5% e secados com ar quente (CANAVESSI et al., 2000). A leitura do filme foi realizada por densitometria em 520nm (Densitômetro digital modelo DS35 – CELM).

#### 4.4.4 Teste de ELISA indireto

##### A) ELISA indireto para quantificação de IgM

O antígeno utilizado foi o BCG cepa Moreau liofilizado, doado pelo Instituto Butantã, São Paulo, Brasil. O bacilo foi aquecido e passou por sonicação por 30 min antes do uso. Placas de poliestireno (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) foram sensibilizadas com 200µg/poço de BCG em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas por 18 h a 8°C. O bloqueio não foi utilizado neste ensaio e as amostras de soro diluídas 1:40 em PBS 0,1% gelatina . As placas foram incubadas por 60 min a 37°C e então lavadas seis vezes com PBS, 0,05% tween-20. Foram incubadas a 37°C com 50µl por poço de anticorpo monoclonal anti-IgM bovino conjugada com peroxidase (1:15.000 em PBS, 0,1% gelatina; Sigma, St Louis, MO, USA) durante 60 min. Finalmente 50µl de substrato cromógeno foi adicionado (5mg of OPD; 20µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5 ml de tampão citrato - fosfato, pH 5,2). A reação foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (50µl/poço) e a leitura realizada a 492 nm. Poços sem soro ou sem antígenos foram usados como controles de reações inespecíficas.

##### B) ELISA indireto para quantificação de IgG

O antígeno utilizado foi o BCG cepa Moreau liofilizado, doado pelo Instituto Butantã, São Paulo, Brasil. O bacilo foi aquecido e passou por sonicação por 30 min antes do uso. Placas de poliestireno (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) foram sensibilizadas com 100µg/poço de BCG em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas por 18 h a 8°C. O bloqueio foi feito por 100µl de PBS 1% gelatina/poço por 120 min a 37°C e as amostras de soro diluídas 1:40 em PBS 0,1% gelatina . As placas foram incubadas por 60 min a 37°C e então lavadas seis vezes com PBS, 0,05% tween-20. Foram incubadas a 37°C com 50µl

por poço de anticorpo monoclonal anti- IgG bovino a conjugada com peroxidase (1:15.000 em PBS, 0,1% gelatina; Sigma, St Louis, MO, USA) durante 60 min. Finalmente 50µl de substrato cromógeno foi adicionado (5mg of OPD; 20µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5 ml de tampão citrato - fosfato, pH 5,2). A reação foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (50µl/poço) e a leitura realizada a 492 nm. Poços sem soro ou sem antígenos foram usados como controles de reações inespecíficas.

#### 4.5 Análise estatística

Inicialmente realizou-se a estatística descritiva dos dados, obtendo-se as médias, desvio padrão e coeficiente de variação para todos os parâmetros avaliados, nas diferentes categorias de amostras. Foi calculado o coeficiente de variação para determinar a instabilidade relativa de cada um dos parâmetros avaliados. Após esta avaliação, optou-se por aplicar os testes não-paramétricos para comparação das médias, pelo fato dos dados obtidos não apresentarem uma curva normal de distribuição.

Para a avaliação global das raças (Curraleiro X Nelore) optou-se por desconsiderar os diferentes momentos e tratamentos. Para analisar as duas raças nos diferentes momentos do estudo desconsideraram-se os tratamentos (Curraleiro - GCC e GCV X Nelore - GNC e GNV). Para analisar a resposta a vacinação com *Mycobacterium bovis* - BCG nos diferentes momentos foram realizadas comparações entre os quatro grupos GCC, GCV, GNC e GNV. Portanto, para efeito da análise estatística, os grupos ficaram assim distribuídos:

- Avaliação global da raça: GCC+GCV x GNC+GNV, desconsiderando tratamentos e momentos.
- Avaliação parcial da raça: GCC+GCV x GNC+GNV, desconsiderando tratamento e considerando os diferentes momentos de colheita.
- Avaliação da vacinação: GCC x GCV x GNC x GNV, considerando os tratamentos e os diferentes momentos de colheita.

Para a comparação das médias nos diferentes momentos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para comparação entre as raças, aplicou-se o teste de

Mann-Whitney (SAMPAIO, 2007). Estas análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas GraphPad InStat e Excel for Windows.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resposta imune inespecífica

#### 5.1.1 Hemograma e bioquímica clínica

Durante o período de adaptação e de desenvolvimento do experimento, os bovinos mantiveram-se hígidos, considerando a avaliação clínica e laboratorial.

Os resultados obtidos na quantificação de leucócitos para os grupos de bezerros das raças Nelore e Curraleiro estão demonstrados na tabela 1.

TABELA 1 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de leucócitos (/ $\mu$ l) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos		Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça
<b>Nelore</b>	Média	<b>9.113<sup>b</sup></b>	<b>9.875<sup>a</sup></b>	<b>9.978<sup>a</sup></b>	<b>8.495<sup>b</sup></b>	<b>7.078<sup>b</sup></b>	<b>8.477<sup>a</sup></b>	<b>8.836<sup>b</sup></b>
	S	2.071	2.924	2.682	2.431	1.524	1.721	2.335
	CV	23	30	27	29	22	20	26
<b>Curraleiro</b>	Média	<b>12.921<sup>a</sup></b>	<b>14.312<sup>a</sup></b>	<b>10.320<sup>a</sup></b>	<b>11.738<sup>a</sup></b>	<b>10.327<sup>a</sup></b>	<b>9.363<sup>a</sup></b>	<b>11.497<sup>a</sup></b>
	S	2.408	4.706	1.018	2.626	1.461	2.183	3.013
	CV	19	33	10	22	14	23	26
<b>P</b>		0,026	0,0649	0,5887	0,0411	0,0043	0,3939	<0,0001

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

Na avaliação global da média da raça, o número de leucócitos dos animais da raça Curraleiro foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao da raça Nelore.

Comparando as raças nos diferentes momentos, observou-se que os valores médios dos leucócitos dos Curraleiros foram numericamente superiores aos dos Nelores em todos os momentos, e significativamente maiores no momento zero ( $p = 0,0260$ ), dias 15 ( $p = 0,0411$ ) e 30 ( $p = 0,0043$ ).

Considerando os grupos vacinado e controle, o número dessas células também apresentaram-se numericamente maiores os dois grupos de Curraleiro, exceto no dia sete quando o grupo Nelore vacinado apresentou a maior média. Houve uma tendência para os valores serem significativamente maiores para os

bezerros do grupo Curraleiro controle nos dias um ( $p= 0,0382$ ) e 30 ( $p=0,0234$ ) (Figura 5).

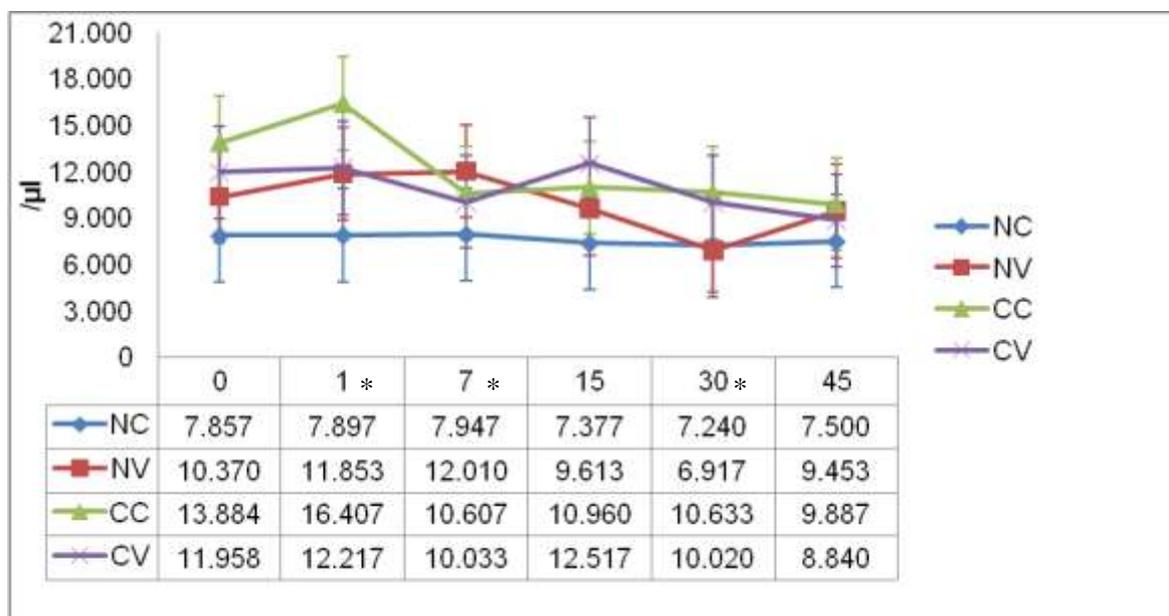


FIGURA 5 - Representação dos valores médios de leucócitos totais ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\* Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0382 nos dias um e sete, e de 0,0234 no dia 30.

NC = Nelore Controle; NV = Nelore Vacinado; CC = Curraleiro Controle; CV = Curraleiro Vacinado.

Quanto aos valores médios absolutos de bastonetes neutrófilos não houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as duas raças (Tabela 2).

Os valores médios dos segmentados neutrófilos (Tabela 2). foram significativamente maiores para a raça Curraleiro ( $p=0,0481$ ). Considerando os diferentes períodos de avaliação, no momento zero a média observada nos bezerros Curraleiro foi significativamente superior ( $p=0,0043$ ). Na comparação entre os quatro grupos também houve tendência dos valores dos grupos de Curraleiro controle e vacinado apresentarem média significativamente maior ( $p=0,0069$ ) no momento zero (Figura 6).

TABELA 2 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de bastonetes (Bast) e segmentados (Seg) neutrófilos dos bezerros Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos			Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça	
<b>Bast</b> (/µl)	Nelore	Média	<b>32<sup>a</sup></b>	<b>133<sup>a</sup></b>	<b>154<sup>a</sup></b>	<b>141<sup>a</sup></b>	<b>143<sup>a</sup></b>	<b>119<sup>a</sup></b>	<b>120<sup>a</sup></b>	
		S	26	185	153	95	136	84	122	
		CV	82	140	99	67	95	70	102	
	Curraleiro	Média	<b>41<sup>a</sup></b>	<b>247<sup>a</sup></b>	<b>241<sup>a</sup></b>	<b>115<sup>a</sup></b>	<b>166<sup>a</sup></b>	<b>50<sup>a</sup></b>	<b>143<sup>a</sup></b>	
		S	57	268	129	133	166	91	166	
		CV	139	109	54	115	100	181	116	
P			0,8182	0,4848	0,3939	0,6991	0,9372	0,2403	0,9820	
<b>Seg</b> (/µl)	Nelore	Média	<b>1.938<sup>b</sup></b>	<b>1.711<sup>a</sup></b>	<b>2.105<sup>a</sup></b>	<b>1.692<sup>a</sup></b>	<b>1.201<sup>a</sup></b>	<b>1.440<sup>a</sup></b>	<b>1.681<sup>b</sup></b>	
		S	367	586	668	785	734	397	641	
		CV	19	34	32	46	61	28	38	
	Curraleiro	Média	<b>3.575<sup>a</sup></b>	<b>3.195<sup>a</sup></b>	<b>1.956<sup>a</sup></b>	<b>2.212<sup>a</sup></b>	<b>2.063<sup>a</sup></b>	<b>1.197<sup>a</sup></b>	<b>2.366<sup>a</sup></b>	
		S	986	2.024	325	669	708	593	1.256	
		CV	28	63	17	30	34	50	53	
	P			0,0043	0,1320	0,9372	0,0931	0,3095	>0,999	0,0481

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

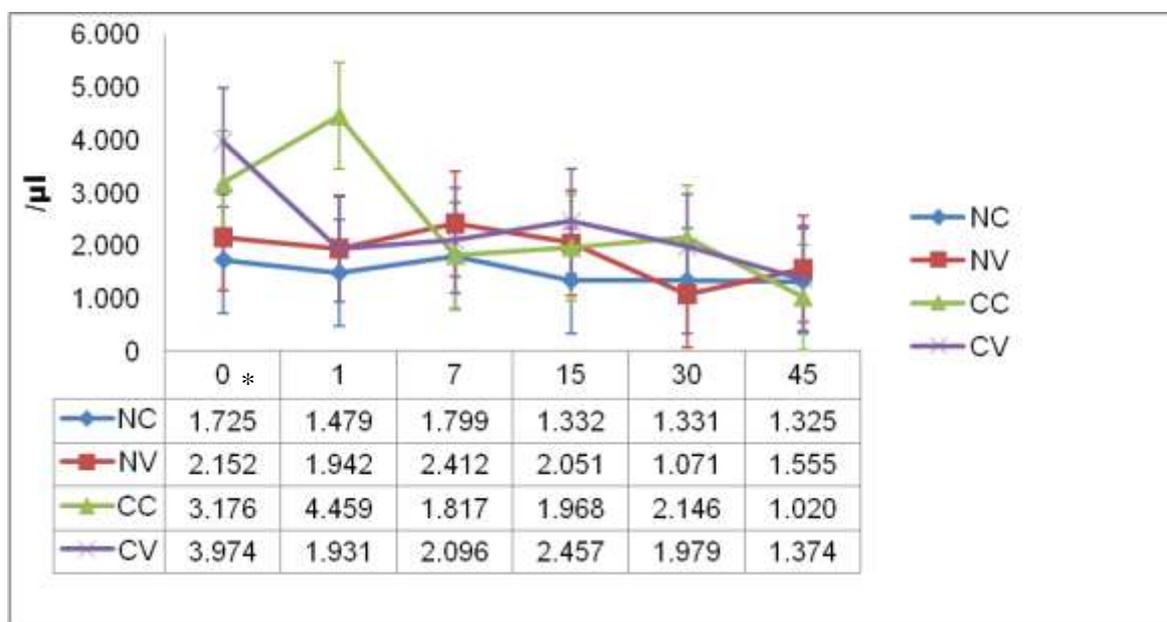


FIGURA 6 - Representação dos valores médios de segmentados neutrófilos (µL) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0069 no momento zero

Os valores médios absolutos de linfócitos dos bovinos Curraleiro foram significativamente maiores ( $p=0,0003$ ), em relação aos valores dos Nelore. Nos diferentes momentos, houve diferença significativa ( $p=0,0152$ ) no dia 30 (Tabela 3), quando as médias dos bezerros Curraleiro mostraram-se superior. Na comparação entre os quatro grupos, os bezerros Nelore do grupo vacinado apresentaram as maiores médias de linfócitos no dia sete, tendendo a significância (Figura 7).

TABELA 3 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de linfócitos ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos		Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça
Nelore	Média	<b>6.840<sup>a</sup></b>	<b>7.781<sup>a</sup></b>	<b>7.328<sup>a</sup></b>	<b>6.202<sup>a</sup></b>	<b>5.403<sup>b</sup></b>	<b>6.561<sup>a</sup></b>	<b>6.686<sup>b</sup></b>
	S	1.853	2.851	2.071	1.515	1.218	1.819	1.970
	CV	27	37	28	24	23	28	29
Curraleiro	Média	<b>10.364<sup>a</sup></b>	<b>10.003<sup>a</sup></b>	<b>7.440<sup>a</sup></b>	<b>8.578<sup>a</sup></b>	<b>7.484<sup>a</sup></b>	<b>7.510<sup>a</sup></b>	<b>8.563<sup>a</sup></b>
	S	4.330	2.588	935	2.025	1.341	1.582	2.545
	CV	42	26	13	24	18	21	30
<b>P</b>		0,0931	0,1320	0,9372	0,0649	0,0152	0,2403	0,0003

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

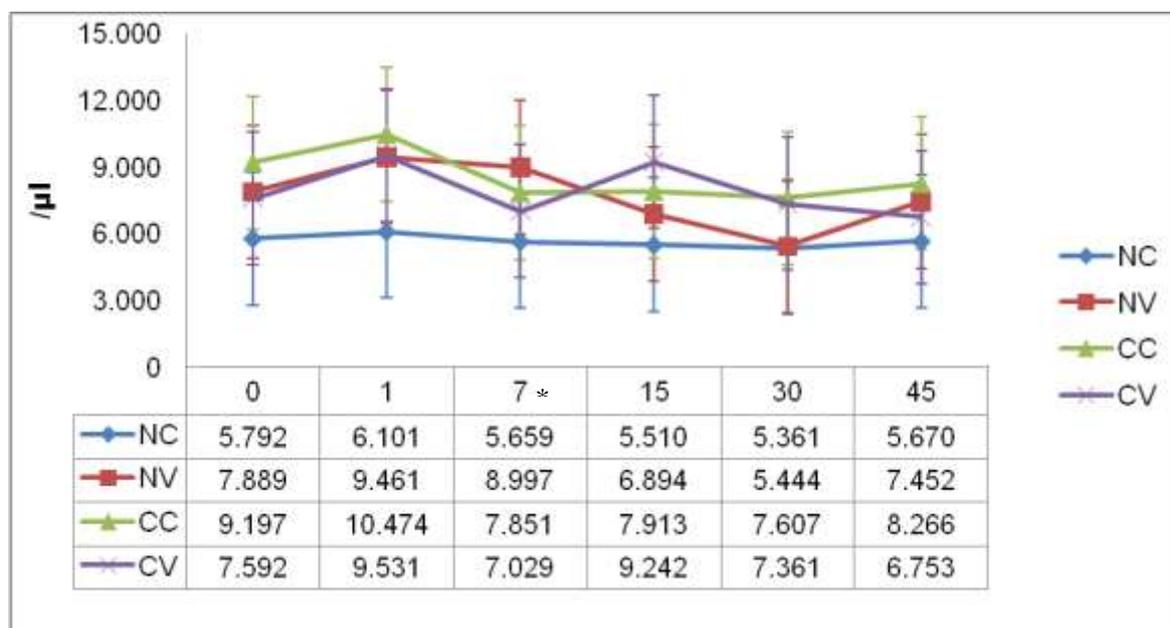


FIGURA 7 - Representação dos valores médios de linfócitos ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0137 no dia sete

Na avaliação dos valores médios absolutos de monócitos (Tabela 4), os valores médios obtidos pelos animais Curraleiro foram significativamente superiores ( $p=0,0005$ ) aos Nelore. Considerando os diferentes períodos, os valores numéricos dos monócitos dos Curraleiros foram mais elevados, entretanto diferença significativa ocorreu somente no dia sete ( $p=0,0260$ ). Na avaliação dos quatro grupos (Figura 8), o grupo Curraleiro controle apresentou tendência a diferença significativa no dia um ( $p<0,0001$ ).

TABELA 4 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do número de monócitos ( $/\mu\text{l}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos		Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça
Nelore	Média	157 <sup>a</sup>	176 <sup>a</sup>	152 <sup>b</sup>	337 <sup>a</sup>	192 <sup>a</sup>	212 <sup>a</sup>	204 <sup>b</sup>
	S	47	115	93	188	119	80	124
	CV	30	66	61	56	62	38	61
Curraleiro	Média	294 <sup>a</sup>	366 <sup>a</sup>	513 <sup>a</sup>	556 <sup>a</sup>	239 <sup>a</sup>	392 <sup>a</sup>	394 <sup>a</sup>
	S	131	366	335	312	86	232	270
	CV	44	100	65	56	36	59	69
<b>P</b>		0,0649	0,1797	0,0260	0,2403	0,6991	0,1320	0,0005

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

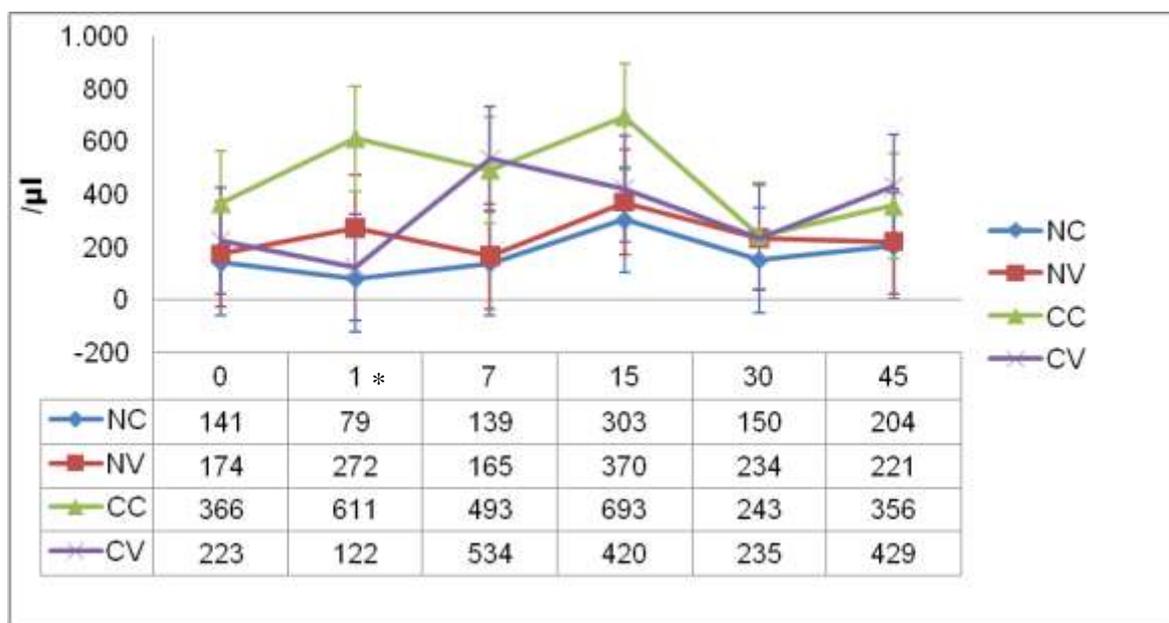


FIGURA 8 - Representação dos valores médios de monócitos ( $/\mu\text{L}$ ) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância  $< 0,0001$  no dia um

Os valores médios das concentrações séricas de proteína, albumina e globulina estão demonstrados na Tabela 5.

TABELA 5 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) de proteínas totais (Prot.), albumina (Alb.) e globulinas (Glob.) dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos			Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça	
<b>Prot. (g/dl)</b>	Nelore	Média	<b>6,38<sup>b</sup></b>	<b>6,43<sup>a</sup></b>	<b>7,30<sup>a</sup></b>	<b>6,58<sup>b</sup></b>	<b>6,73<sup>a</sup></b>	<b>6,65<sup>a</sup></b>	<b>6,68<sup>b</sup></b>	
		S	0,32	0,54	0,88	0,19	0,76	0,69	0,64	
		CV	5,00	8,32	12,04	2,95	11,22	10,45	9,65	
	Curraleiro	Média	<b>7,82<sup>a</sup></b>	<b>7,27<sup>a</sup></b>	<b>7,68<sup>a</sup></b>	<b>7,22<sup>a</sup></b>	<b>7,45<sup>a</sup></b>	<b>7,02<sup>a</sup></b>	<b>7,41<sup>a</sup></b>	
		S	0,95	0,73	0,52	0,47	0,57	0,62	0,67	
		CV	12,20	10,06	6,76	6,52	7,63	8,80	9,11	
	P		0,0043	0,0649	0,4848	0,0087	0,1797	0,3939	<0,0001	
	<b>Alb. (g/dl)</b>	Nelore	Média	<b>3,08<sup>a</sup></b>	<b>3,09<sup>a</sup></b>	<b>2,88<sup>a</sup></b>	<b>2,85<sup>a</sup></b>	<b>2,47<sup>a</sup></b>	<b>2,64<sup>a</sup></b>	<b>2,83<sup>a</sup></b>
			S	0,36	0,31	0,81	0,37	0,48	0,38	0,50
CV			11,77	10,07	28,19	13,06	19,38	14,26	17,70	
Curraleiro		Média	<b>3,07<sup>a</sup></b>	<b>3,19<sup>a</sup></b>	<b>3,50<sup>a</sup></b>	<b>2,94<sup>a</sup></b>	<b>2,40<sup>a</sup></b>	<b>2,83<sup>a</sup></b>	<b>2,99<sup>a</sup></b>	
		S	0,45	0,28	0,93	0,49	0,40	0,33	0,59	
		CV	14,62	8,84	26,63	16,59	16,54	11,50	19,89	
P			0,8182	0,5887	0,3095	0,8182	0,9372	0,3095	0,4957	
<b>Glob. (g/dl)</b>		Nelore	Média	<b>3,31<sup>b</sup></b>	<b>3,34<sup>a</sup></b>	<b>4,42<sup>a</sup></b>	<b>3,73<sup>a</sup></b>	<b>4,63<sup>a</sup></b>	<b>4,02<sup>a</sup></b>	<b>3,91<sup>b</sup></b>
			S	0,50	0,55	1,26	0,37	0,87	0,68	0,87
	CV		15,19	16,51	28,58	9,85	18,85	16,86	22,29	
	Curraleiro	Média	<b>4,74<sup>a</sup></b>	<b>4,08<sup>a</sup></b>	<b>4,18<sup>a</sup></b>	<b>4,28<sup>a</sup></b>	<b>5,35<sup>a</sup></b>	<b>4,19<sup>a</sup></b>	<b>4,47<sup>a</sup></b>	
		S	1,24	0,94	0,61	0,61	0,70	0,61	0,88	
		CV	26,09	23,02	14,63	14,37	13,02	14,59	19,78	
	P		0,0152	0,1320	0,5887	0,1797	0,2403	0,9372	0,0078	

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

Os valores médios de proteínas ( $p < 0,0001$ ) e globulinas ( $p = 0,0078$ ) séricas obtidos pelos bezerros Curraleiro foram significativamente superiores aos apresentados pelos Nelore. De modo geral, durante todo o período experimental, as concentrações de globulina e, conseqüentemente, de proteínas totais dos Curraleiros foram superiores as dos Nelore. Foram detectadas diferenças significativas no momento zero ( $p = 0,0043$ ) e dia 15 ( $p = 0,0087$ ) para as proteínas e dia zero ( $p = 0,0152$ ) para as globulinas (Tabela 5).

Não houve diferença significativa para a albumina em nenhuma das comparações realizadas (Tabela 5). Considerando os quatro grupos experimentais também não foram observadas diferenças para as proteínas, albumina e globulinas em nenhum dos momentos avaliados ( $p < 0,05$ ).

A relação albumina:globulina não demonstrou diferença significativa entre os valores médios obtidos pelos animais em estudo, em nenhum momento do experimento (Tabela 6).

TABELA 6 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) da relação albumina:globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos		Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça
<b>Nelore</b>	Média	<b>0,96<sup>a</sup></b>	<b>0,95<sup>a</sup></b>	<b>0,74<sup>a</sup></b>	<b>0,81<sup>a</sup></b>	<b>0,51<sup>a</sup></b>	<b>0,68<sup>a</sup></b>	<b>0,77<sup>a</sup></b>
	S	0,25	0,20	0,39	0,19	0,10	0,16	0,27
	CV	26,53	21,22	52,22	23,79	19,39	23,52	34,69
<b>Curraleiro</b>	Média	<b>0,70<sup>a</sup></b>	<b>0,82<sup>a</sup></b>	<b>0,88<sup>a</sup></b>	<b>0,71<sup>a</sup></b>	<b>0,48<sup>a</sup></b>	<b>0,69<sup>a</sup></b>	<b>0,71<sup>a</sup></b>
	S	0,24	0,20	0,34	0,21	0,12	0,15	0,24
	CV	34,77	24,81	38,52	29,93	24,09	21,90	33,77
<b>P</b>		0,0931	0,3095	0,5887	0,4848	0,4848	0,8182	0,3081

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

### 5.1.2 Frações globulínicas

Comparando o perfil eletroforético das frações globulínicas das duas raças, os bezerros Curraleiro apresentaram valores superiores das frações alfa-1 ( $p=0,0028$ ), beta ( $p < 0,0001$ ) e gama globulina ( $p=0,0005$ ), enquanto os bezerros Nelore mostraram média mais elevada ( $p=0,0065$ ) da fração alfa-2 globulina (Tabela 7).

Considerando as raças nos diferentes momentos (Tabela 9) os valores apresentados pelos Curraleiros foram significativamente maiores nas frações alfa-1 globulina no momento zero ( $p=0,0022$ ); beta globulina nos dias zero, um e 15 ( $p=0,0022$ ) e gama globulina no momento zero ( $p=0,0043$ ) e dia um ( $p=0,0152$ ). Para a raça Nelore os valores foram significativamente maiores na fração alfa-2 nos dias um ( $p=0,0411$ ) e 15 ( $p=0,0260$ ).

TABELA 7 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) das frações globulínicas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupo			Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça	
<b>Alfa-1</b>	Nelore	Média	<b>0,59<sup>b</sup></b>	<b>0,52<sup>a</sup></b>	<b>0,58<sup>a</sup></b>	<b>0,55<sup>a</sup></b>	<b>0,63<sup>a</sup></b>	<b>0,45<sup>a</sup></b>	<b>0,55<sup>b</sup></b>	
		S	0,07	0,05	0,08	0,04	0,09	0,05	0,09	
		CV	11,94	9,26	13,71	6,47	14,81	11,94	15,46	
	Curraleiro	Média	<b>0,79<sup>a</sup></b>	<b>0,59<sup>a</sup></b>	<b>0,74<sup>a</sup></b>	<b>0,63<sup>a</sup></b>	<b>0,66<sup>a</sup></b>	<b>0,51<sup>a</sup></b>	<b>0,65<sup>a</sup></b>	
		S	0,08	0,15	0,16	0,09	0,10	0,09	0,14	
		CV	9,99	25,55	21,76	14,53	15,42	16,91	21,79	
	P		0,0022	0,6991	0,0931	0,0649	0,8182	0,2403	0,0028	
	<b>Alfa-2</b>	Nelore	Média	<b>0,89<sup>a</sup></b>	<b>0,87<sup>a</sup></b>	<b>0,98</b>	<b>0,91<sup>a</sup></b>	<b>0,98<sup>a</sup></b>	<b>0,82<sup>a</sup></b>	<b>0,91<sup>a</sup></b>
			S	0,11	0,08	0,15	0,04	0,14	0,08	0,12
CV			12,37	9,59	15,24	4,63	14,25	9,94	12,75	
Curraleiro		Média	<b>0,99<sup>a</sup></b>	<b>0,76<sup>b</sup></b>	<b>0,88</b>	<b>0,76<sup>b</sup></b>	<b>0,85<sup>a</sup></b>	<b>0,75<sup>a</sup></b>	<b>0,83<sup>b</sup></b>	
		S	0,09	0,09	0,06	0,10	0,12	0,08	0,12	
		CV	9,16	11,91	6,68	13,16	14,46	11,25	14,85	
P			0,0649	0,0411	0,1320	0,0260	0,0931	0,1797	0,0065	
<b>Beta</b>		Nelore	Média	<b>0,69<sup>b</sup></b>	<b>0,66<sup>b</sup></b>	<b>0,71<sup>a</sup></b>	<b>0,72<sup>b</sup></b>	<b>0,77<sup>a</sup></b>	<b>0,82<sup>a</sup></b>	<b>0,73<sup>b</sup></b>
			S	0,08	0,05	0,13	0,06	0,13	0,09	0,10
	CV		12,19	7,46	18,07	8,19	16,27	11,41	14,14	
	Curraleiro	Média	<b>1,05<sup>a</sup></b>	<b>0,84<sup>a</sup></b>	<b>0,79<sup>a</sup></b>	<b>0,90<sup>a</sup></b>	<b>0,95<sup>a</sup></b>	<b>1,00<sup>a</sup></b>	<b>0,92<sup>a</sup></b>	
		S	0,18	0,13	0,15	0,07	0,15	0,23	0,18	
		CV	17,14	16,01	19,45	8,31	16,37	23,21	19,12	
	P		0,0022	0,0022	0,4848	0,0022	0,1797	0,0931	<0,0001	
	<b>Gama</b>	Nelore	Média	<b>1,91<sup>b</sup></b>	<b>1,65<sup>b</sup></b>	<b>1,89<sup>a</sup></b>	<b>1,98<sup>a</sup></b>	<b>2,13<sup>a</sup></b>	<b>1,67<sup>a</sup></b>	<b>1,87<sup>b</sup></b>
			S	0,23	0,24	0,34	0,22	0,55	0,35	0,36
CV			12,27	14,77	17,98	10,94	25,77	20,92	19,25	
Curraleiro		Média	<b>2,79<sup>a</sup></b>	<b>2,13<sup>a</sup></b>	<b>2,18<sup>a</sup></b>	<b>2,14<sup>a</sup></b>	<b>2,46<sup>a</sup></b>	<b>1,98<sup>a</sup></b>	<b>2,28<sup>a</sup></b>	
		S	0,46	0,48	0,51	0,38	0,47	0,48	0,51	
		CV	16,40	22,54	23,56	17,69	19,22	23,99	22,30	
P			0,0043	0,0152	0,3939	0,6991	0,1797	0,2403	0,0005	

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

Entre os grupos vacinados a fração alfa-1 globulinas apresentou tendência a significância nas médias obtidas no momento zero ( $p=0,0108$ ) com maiores valores para os grupos CC e CV (Figura 7). Não houve diferença significativa para alfa-2 globulinas entre os grupos vacinados.

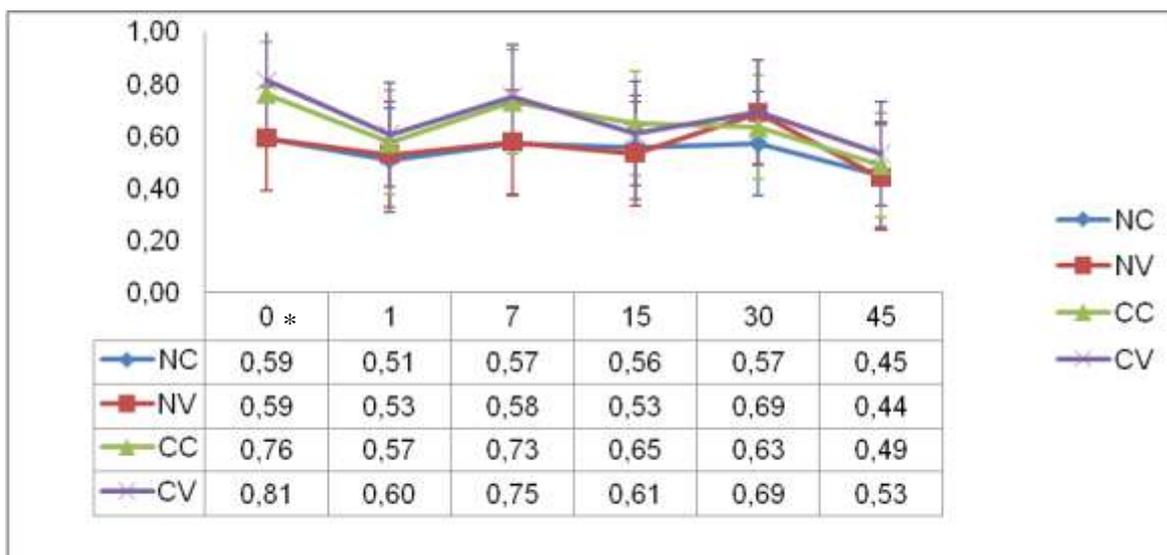


FIGURA 9 - Representação dos valores médios da fração alfa-1 globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0108 no momento zero

A fração beta globulinas apresentou tendência a significância nas médias obtidas entre os quatro grupos vacinados, nos dias zero ( $p=0,0084$ ), um ( $p=0,0375$ ) e 15 ( $p=0,0020$ ), com a média do grupo de bezerros Curraleiro respectivamente vacinado e controle, apresentando maiores valores (Figura 10).

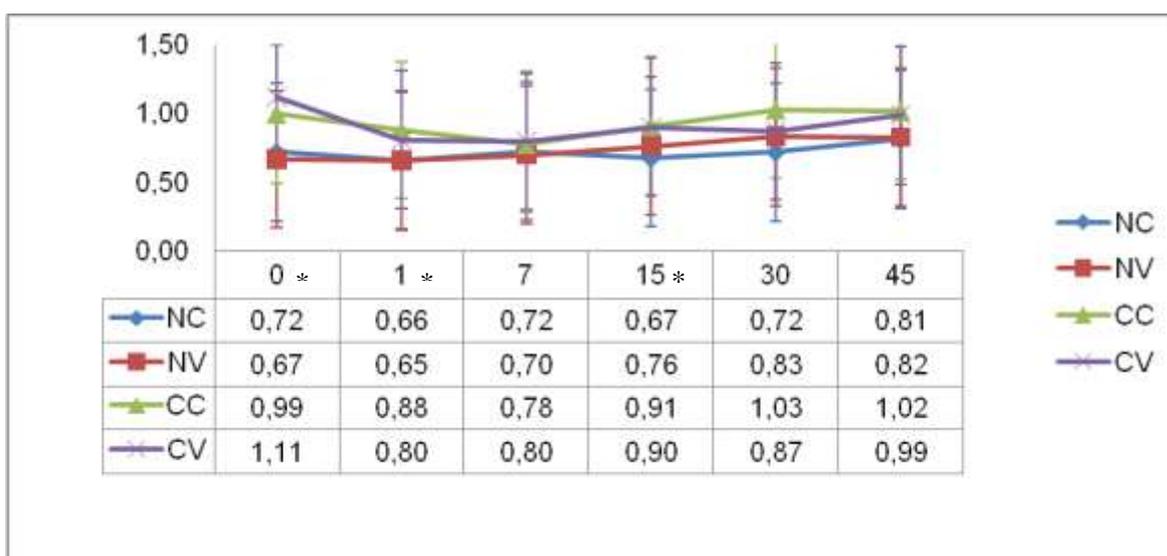


FIGURA 10 - Representação dos valores médios da fração beta globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0084 no momento zero, 0,0375 no dia um e 0,0020 no dia 15

Houve tendência a significância na fração gama globulinas somente no momento zero ( $p=0,470$ ). Com valores maiores para o grupo constituído pelos bezerros Curraleiro controle (Figura 11).

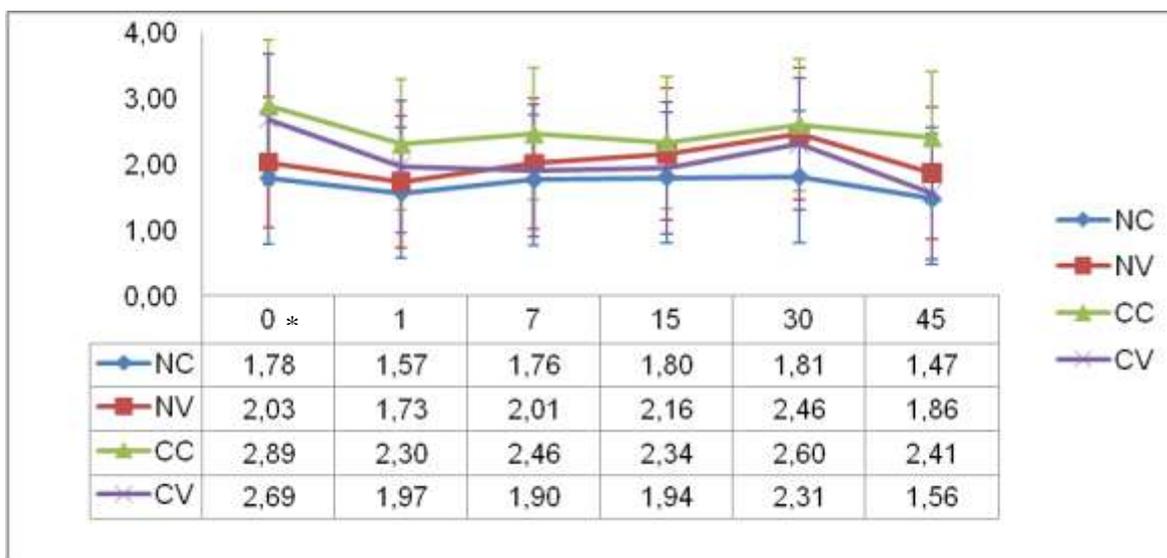


FIGURA 11 - Representação dos valores médios da fração gama globulinas dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0470 no momento zero e 0,0408 no GCV

## 5.2 Resposta imune humoral

### 5.2.1 IgM

Os bovinos da raça Curraleiro apresentaram maiores concentrações ( $p=0,0076$ ) de IgM *M. bovis* específica (Tabela 8 e Figura 12). Considerando os diferentes períodos avaliados, os valores médios obtidos pelos animais Curraleiro na quantificação de IgM foram numericamente maiores aos valores apresentados pelos Nelore (Tabela 8). Na avaliação dos quatro tratamentos o grupo Curraleiro vacinado apresentou as maiores concentrações de IgM *M. bovis* específica, mas não foram detectadas tendências a diferenças significativas (Figura 13).

TABELA 8 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) de densidade óptica de IgM *M. bovis* específicos dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos		Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça
<b>Nelore</b>	Média	<b>0,157<sup>a</sup></b>	<b>0,138<sup>a</sup></b>	<b>0,152<sup>a</sup></b>	<b>0,108<sup>a</sup></b>	<b>0,174<sup>a</sup></b>	<b>0,138<sup>a</sup></b>	<b>0,144<sup>b</sup></b>
	S	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04
	CV	34,51	26,61	24,72	36,92	16,53	18,23	28,37
<b>Curraleiro</b>	Média	<b>0,204<sup>a</sup></b>	<b>0,183<sup>a</sup></b>	<b>0,175<sup>a</sup></b>	<b>0,139<sup>a</sup></b>	<b>0,200<sup>a</sup></b>	<b>0,181<sup>a</sup></b>	<b>0,180<sup>a</sup></b>
	S	0,04	0,07	0,05	0,04	0,06	0,05	0,05
	CV	18,86	36,08	26,31	27,33	27,71	26,08	28,09
<b>P</b>		0,2403	0,3095	0,5887	0,3939	0,3939	0,0649	0,0076

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

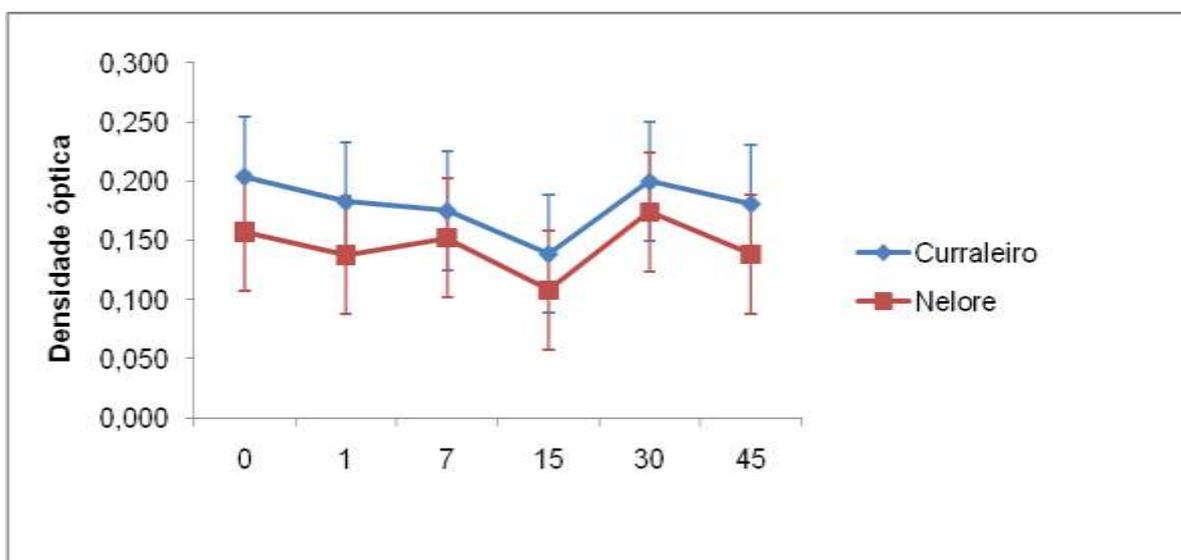


FIGURA 12 - Representação gráfica dos valores médios para quantificação de IgM-*M. bovis* específica por meio do teste de ELISA

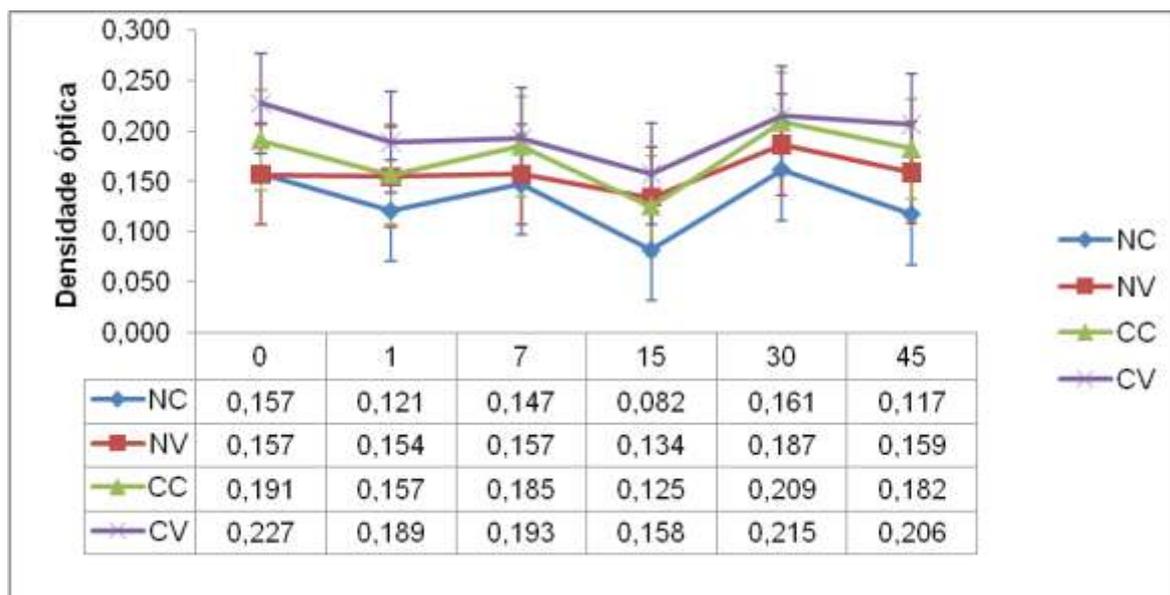


FIGURA 13 - Representação dos valores médios de IgM-*M. bovis* específica dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

### 5.2.2 IgG

Na avaliação global da quantificação de IgG *M. bovis* específicas (Tabela 9) entre as raças estudadas, os valores médios obtidos pelos animais Curraleiro foram significativamente maiores ( $p=0,0005$ ) quando comparados aos animais da raça Nelore. Sendo também maiores para os Curraleiros no momento zero ( $p=0,0043$ ) e dia um ( $p=0,0087$ ), quando considerados os diferentes períodos de avaliação. Também considerando os diferentes momentos, os valores médios obtidos pelos animais Curraleiro na quantificação de IgG foram numericamente maiores aos valores apresentados pelos Nelore.

Entre os grupos vacinados observou-se que os valores médios na mensuração de IgG (Figura 14) também apresentaram tendência a serem mais elevados para os bezerros do grupo de Curraleiro vacinado, nos dias zero ( $p=0,0293$ ) e um ( $p=0,0382$ ).

TABELA 9 – Valores médios, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) de densidade óptica de IgG-*M. bovis* específica dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro, Goiânia, 2009

Grupos		Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Média da raça
Nelore	Média	<b>0,373<sup>b</sup></b>	<b>0,275<sup>b</sup></b>	<b>0,341<sup>a</sup></b>	<b>0,269<sup>a</sup></b>	<b>0,223<sup>a</sup></b>	<b>0,270<sup>a</sup></b>	<b>0,292<sup>b</sup></b>
	S	0,06	0,09	0,09	0,08	0,05	0,06	0,08
	CV	15,87	31,39	27,03	28,96	24,23	23,20	29,06
Curraleiro	Média	<b>0,555<sup>a</sup></b>	<b>0,489<sup>a</sup></b>	<b>0,352<sup>a</sup></b>	<b>0,387<sup>a</sup></b>	<b>0,310<sup>a</sup></b>	<b>0,323<sup>a</sup></b>	<b>0,403<sup>a</sup></b>
	S	0,11	0,18	0,09	0,11	0,11	0,09	0,14
	CV	20,28	37,50	25,33	27,91	37,05	27,79	35,75
<b>P</b>		0,0043	0,0087	0,9372	0,0649	0,1320	0,2403	0,0005

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney

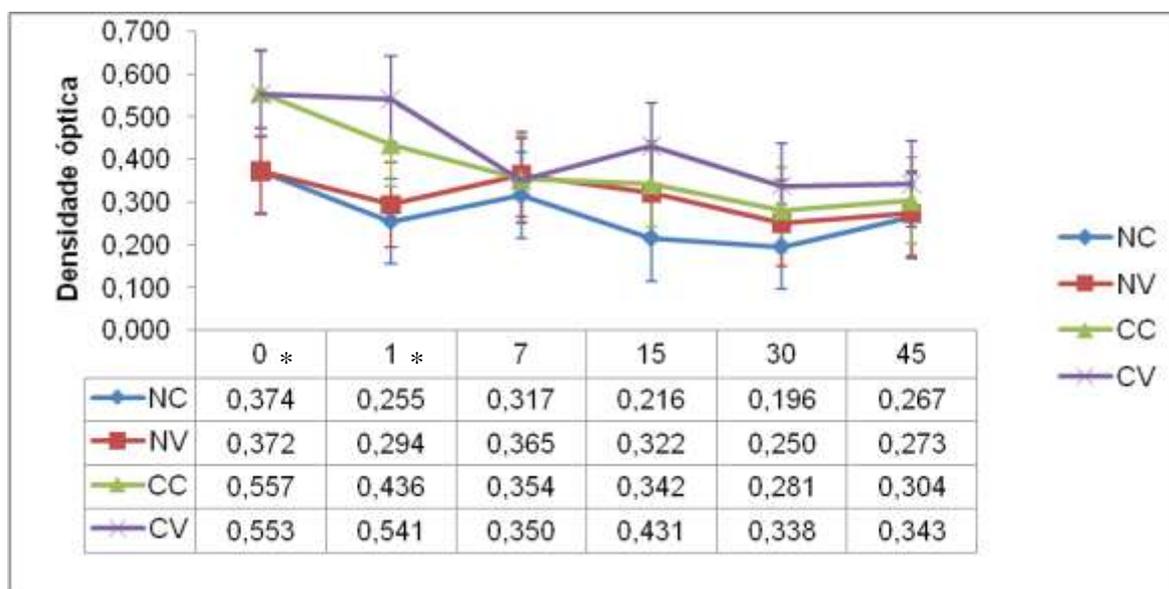


FIGURA 14 - Representação gráfica dos valores médios de IgG-*M. bovis* específica dos bezerros das raças Nelore e Curraleiro agrupados de acordo com a vacinação

\*Diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,0293 no momento zero e 0,0382 no dia um

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Resposta imune inespecífica

Os valores médios absolutos de leucócitos totais nos bezerros Curraleiro durante todo o período do experimento mantiveram-se relativamente constantes e corresponderam aos valores de referência para a raça, descritos por PAULA NETO (2004) e MORAES et al. (2009). Os resultados obtidos pelos bezerros Nelore também se mantiveram constantes e corresponderam aos valores de referência da raça na mesma faixa etária e sexo, avaliados por FAGLIARI et al. (1998).

Os animais da raça Curraleiro apresentam maior quantidade de leucócitos para atuar na resposta imunológica do organismo. Segundo ABBAS et al. (2008) os leucócitos são a defesa do organismo contra agentes infecciosos e substâncias estranhas. Para defender o corpo adequadamente, uma quantidade suficiente de leucócitos deve estimular as respostas apropriadas, ir ao local de infecção e, em seguida, eliminar e digerir os organismos e as substâncias prejudiciais. Como todas as células sangüíneas, os leucócitos são produzidos na medula óssea. Eles originam-se de células precursoras (células tronco) que amadurecem no decorrer do tempo como um dos cinco tipos principais de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Os valores médios absolutos de bastonetes neutrófilos foram semelhantes entre as raças estudadas e para os Curraleiros estiveram dentro dos valores de normalidade (PAULA NETO, 2004). Os bovinos Nelore apresentaram valores superiores aos relatados por COSTA et al. (2000) e BENESI et al. (2002).

Os bezerros da raça Curraleiro obtiveram valores médios superiores aos valores apresentados pelos da raça Nelore no número de segmentados neutrófilos, sendo estes valores considerados dentro da faixa de normalidade para a raça conforme proposto por PAULA NETO (2004). Já os valores médios obtidos pelos bezerros Nelore neste estudo, de modo geral, foram menores que os valores de referência apresentados por FAGLIARI et al. (1998).

Os bovinos Curraleiro demonstraram produzir maiores quantidades de neutrófilos, fundamental na resposta imune inata. Para ROITT et al. (2003); BALESTIERI (2006) e JANEWAY et al. (2007) a resposta imune inata é inespecífica, realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos, os quais identificam a partícula antigênica, fagocitam-na e desencadeiam a liberação de citocinas que contribuem para a instalação do processo inflamatório e para a intensificação da resposta imune, e desencadear uma resposta imune mais específica ao tipo de patógeno.

Neste estudo, foi observado que o número absoluto de linfócitos dos bezerros Curraleiro apresentaram valores correspondentes a raça conforme PAULA NETO (2004) e MORAES et. al. (2009). Para os bezerros Nelore a média foi maior que os valores descritos por FAGLIARI et. al. (1998).

Os bezerros da raça Curraleiro apresentam maiores contagens de linfócitos. Segundo TIZARD (2002) os linfócitos são células do sistema imune que conferem especificidade à resposta imunológica por serem portadoras de receptores específicos para os determinantes antigênicos presentes nos antígenos. São, portanto, as células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos estranhos e pela montagem das respostas imunes específicas. Para BALESTIERI (2006) como existem diferentes formas de resposta imune, é razoável que existam várias populações e sub-populações de linfócitos, cada uma com características e funções diferentes.

Os valores médios absolutos de monócitos para as duas raças estiveram dentro dos valores de normalidade (COSTA et al., 2000; PAULA NETO, 2004). Nos bezerros da raça Curraleiro foram detectados os maiores valores de monócitos em relação aos Nelores.

Os monócitos constituem 5% a 10% dos leucócitos circulantes e têm uma reduzida meia-vida, passando aproximadamente 24 horas no sangue. Estes entram no *pool* extravascular e tornam-se residentes nos tecidos, onde são denominados macrófagos. Os macrófagos são os responsáveis pela proteção dos tecidos, participam da resposta imune inata, intervêm na defesa do organismo contra agentes infecciosos, como o *Mycobacterium bovis* (BALESTIERI, 2006) Sendo assim, os bovinos Curraleiro demonstraram disponibilizar maior número dessa célula, essencial na resposta imune inata.

Os valores bioquímicos de proteínas, albumina e globulinas séricas obtidos pelos bovinos Curraleiro foram similares aos estabelecidos como valores de referência para a raça descritos por BARINI (2007). Os bovinos Nelore, de modo geral, apresentaram valores semelhantes aos descritos por FAGLIARI et al. (1998).

Os valores mais elevados de proteína total detectados nos Curraleiros foram atribuídos as maiores concentração de globulinas, uma vez que as mensurações de albumina das duas raças foram semelhantes. Segundo LEAL et al. (2003) as proteínas são compostos indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, hormônios na regulação endócrina, nutrientes, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica, como anticorpos. Segundo DUNCAN & PRASSE (2003), as globulinas podem ser divididas em três categorias de acordo com a sua mobilidade eletroforética em globulinas alfa, beta e gama. Então, elevadas concentrações de globulina total refere-se a maiores valores de suas frações, avaliados por meio de eletroforese.

Os valores de todas as frações globulínicas dos bezerros da raça Curraleiro se encontraram próximos aos registrados para a raça por SANTIN (2008) se divergindo em algumas médias, fato que pode ser atribuído por diferença na faixa etária e sexo dos animais. O que pode ser verificado nos estudos realizados por CANAVESSI et al. (2000) com animais da raça Nelore.

Os valores da fração alfa-1 globulinas dos bezerros Curraleiro apresentaram-se próximos aos valores de referência para a raça, descritos por SANTIN (2008). Os resultados obtidos pelos bezerros Nelore corresponderam aos valores de referência da raça na mesma faixa etária e sexo, avaliados por CANAVESSI et al. (2000). Os animais Curraleiros apresentaram valores mais elevados comparados aos Nelores nesta fração globulínica. Demonstrando disponibilizar maiores quantidades de algumas proteínas de fase aguda. Pois, conforme SILVA et. al. (2008b) essa fração é constituída por um conjunto de várias proteínas, entre as quais a alfa-1-antitripsina, protrombina, transcortina, globulina ligadora de tiroxina e alfa-fetoproteína. Em geral, há aumento dessa fração em processos inflamatórios, infecciosos e imunes, de forma inespecífica.

Na fração alfa-2 globulinas os Curraleiros demonstraram valores próximos aos registrados por SANTIN (2008). Os Nelores apresentaram valores maiores em relação aos dispostos por CANAVESSI et al. (2000) e também comparados aos resultados dos bezerros Curraleiros. Evidenciando que os animais da raça Nelore apresentaram concentrações mais elevadas de algumas proteínas de fase aguda. Segundo SILVA et al. (2008b) a fração alfa-2 é constituída por um grupo variado de proteínas, entre elas a haptoglobina, a alfa-2-macroglobulina, a ceruloplasmina, a eritropoetina e a colinesterase. Da mesma forma que as alfa-1 globulinas, as proteínas pertencentes a essa banda também se comportam como proteínas de fase aguda, aumentando sua concentração na presença de infecção, em processos inflamatórios e imunes.

Na avaliação da fração beta globulinas os bezerros da raça Curraleiro apresentaram valores próximos aos registrados por SANTIN (2008). E os valores apresentados pelos Nelores foram inferiores aos descritos por CANAVESSI et al. (2000) e também quando confrontados aos valores dos bezerros Curraleiro. Sendo assim, os animais da raça Curraleiro demonstraram dispor de maiores concentrações da fração beta globulinas, que de acordo com SILVA et al. (2008b) é composta por um grupo heterogêneo de proteínas das quais as principais são: beta-lipoproteínas, transferrina, componente C3 e C4 do complemento, fibrinogênio, microglobulina e IgA, associadas a fase aguda de infecções e a atividade imunológica do organismo.

Para a fração gama globulinas os bezerros Curraleiros apresentaram valores próximos aos descritos por SANTIN (2008). Os valores apresentados pelos Nelores foram superiores aos registrados por CANAVESSI et al. (2000). Os valores apresentados pelos bezerros da raça Curraleiro foram superiores aos Nelores, demonstrando que a que os bezerros Curraleiro dispuseram de maiores concentrações de imunoglobulinas, pois conforme SILVA et al. (2008b) e KANEKO (1997) esta fração é constituída por imunoglobulinas (Igs), com diferentes classes G, A, M e E, sendo os anticorpos produzidos pelos plasmócitos, quando estimulados por antígenos ou devido à desordem clonal maligna dessas células. Sendo assim, os bovinos da raça Curraleiro apresentaram maior concentração da fração gama globulinas associadas à atividade imunológica do organismo, quando comparados aos da raça Nelore.

Quanto a relação albumina:globulina observações feitas por BACILA (2003), revelaram ser importante na avaliação de infecções pois, quando elas se alteram, invertendo-se os valores pelo incremento que ocorre na concentração das imunoglobulinas, especialmente as  $\gamma$ -globulinas.

A relação albumina:globulina entre as raças avaliadas apresentaram valores médios semelhantes e foram inferiores aos registrados por KANEKO (1997) e CANAVESSI et. al. (2000) fato este que pode ser remetido a aumentos das frações globulínicas (beta e gama globulinas) associados a maior atividade imunogênica, segundo KANEKO (1997). PIERCE (1955) descreveu que a concentração de albumina controla a pressão colóide osmótica. Portanto, os valores de albumina são inversamente proporcionais aos de globulina total, o que concorda com os achados das duas variáveis no estudo. Sendo, todavia os valores da relação albumina:globulina similares aos apresentados por SILVA et. al. (2008a) em estudos realizados para bovinos confinados.

## 6.2 Resposta imune humoral

Na comparação global dos valores médios da quantificação das IgM e IgG *M. bovis* específicas entre as raças estudadas, foi observado que os bezerros Curraleiro mantiveram valores superiores aos bezerros Nelore. Ou seja, tanto na avaliação da resposta imune humoral menos específica (IgM) quanto mais específica (IgG) os animais Curraleiro foram mais eficientes em produzir quantidades maiores de anticorpos.

Entre os grupos vacinados nas quantificações de IgM e IgG *M. bovis* específicas o comportamento apresentou-se de modo semelhante, em que o grupo que apresentou maiores valores foi o composto por Curraleiro vacinado, seguidos pelo Curraleiro controle, posteriormente Nelore vacinado e por fim Nelore controle, com as menores concentrações. Este comportamento demonstra que os animais da raça Curraleiro foram mais eficientes em produzir anticorpos específicos quando vacinados em relação ao grupo controle da raça. E mesmo o grupo controle da raça Curraleiro produziu mais anticorpos específicos quando comparados aos grupos de Nelore.

Pode-se associar a maior eficiência na resposta específica dos bezerros da raça Curraleiro a uma característica natural da raça em responder melhor quando vacinados ou não a um patógeno. JULIANO (2006) propôs que embora bovinos Curraleiro apresentassem soro positividade para *Neospora caninum* de 38,24% avaliados por meio de teste de ELISA indireto, sendo esta prevalência superior aos registrados na literatura para outras raças em diferentes regiões, não havia relatos de surtos de abortamentos, e as informações obtidas mostraram que a ocorrência de diarreias em bezerros era comum, mas os animais se recuperavam e a mortalidade inespecífica foi estimada entre 1% a 2%. Segundo os tratadores os animais adultos raramente adoeciam. Esses resultados corroboram a possibilidade de resposta imunológica mais eficiente da raça Curraleiro.

BITTAR et al. (2004) sugeriram que o perfil fenotípico do sangue periférico de bovinos europeus pode influenciar no padrão da imunidade apresentada pelos animais, relacionando o menor nível de linfócitos T (CD4 e CD8) em animais da raça Holandesa a sua susceptibilidade a infecções por *Babesia* sp., enquanto maiores níveis de linfócitos T justificariam a maior resistência da raça Hereford às infecções parasitárias. Fundamentado nesse raciocínio, MORAES et al. (2009) concluiu parecer coerente que isso possa ser extrapolado aos animais da raça Curraleiro, visto que estes apresentaram alto nível de linfócitos T circulantes e são animais que sabidamente apresentam maior resistência às infecções hemoparasitárias. Além do alto nível de linfócitos T circulantes, os autores ainda inferiram que a proporção de linfócitos T e B circulantes também podem estar envolvidas na imunidade clínica, sendo que animais com maior proporção T:B apresentam maior resistência às hemoparasitoses, o que ocorre com bovinos Curraleiros. No presente estudo podemos inferir que a raça Curraleiro pode ter melhor imunidade clínica, baseado no fundamento de que os animais produzem mais células leucocitárias, visto que isto foi verificado comparando com a raça Nelore.

Outras evidências que sugerem ser inata a resistência de animais da raça Curraleiro foram os resultados soroepidemiológicos, obtidos por JULIANO (2006), acerca de babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e leptospirose (*Leptospira interrogans*), demonstrando que apesar dos animais estarem

expostos cronicamente a esses patógenos, não houve alteração hematológica e da bioquímica sérica que indicasse algum estado mórbido. Ao contrário, houve evidências de que esses bovinos apresentam imunidade contra tais agentes, sem manifestação clínica da doença, indicando resistência ou adaptação suficiente do hospedeiro (MORAES et al., 2009).

As evidências de maior resistência dos animais Curraleiros deve ser melhor entendido, para tanto estudos que avaliam genética e imunologicamente estes animais devem ser realizados. Como os trabalhos realizados em diferentes raças de bovinos avaliando-se genética e imunologicamente a associação da resistência natural a agentes patogênicos. Por exemplo, ABLES et al. (2002) averiguaram a associação entre resistência natural a *M. bovis* e *B. abortus* e a presença de *Nramp1* em diferentes raças de bovinos e búfalos; WESTTHUSIN et al. (2007) utilizando touro Black Angus apresentando resistência genética a *B. abortus* e seus clones resistentes também a *M. bovis* e *S. typhimurium*; DIETZ et al. (1997 a e b) e PASHMI et al. (2009) que investigaram a associação entre alelos DRB 3.2 do BoLA e variáveis imunológicas significativa com funções dos leucócitos em relação a resistência a mastite em bovinos da raça holandesa.

A utilização de vacinas com diferentes microorganismos e posterior avaliação e monitoramento da resposta imune humoral por meio do teste de ELISA indireto são freqüentemente realizados, como o trabalho realizado por COX et.al. (1993) que analisou a resposta de anticorpos (IgG) específicos para um gene de glicoproteínas do herpesvírus 1 bovino (BHV-1), candidato ao desenvolvimento de uma vacina. O monitoramento da resposta imune foi realizado por meio do teste de ELISA IgG específica.

As maiores contagens de leucócitos, as mais elevadas concentrações de globulinas e anticorpos específicos apresentadas pelos Curraleiros reforçam a existência de uma provável resistência natural, fato que pode ser atribuído a sua rusticidade. CARVALHO & AMORIM (1989), MARIANTE & CAVALCANTE (2000) e JULIANO (2006), relatam que a raça Curraleiro formou-se em regime de criação superextensiva, com mínimos cuidados sanitários e alimentares. Além disso, a raça adaptou-se ao calor e à seca, o que resultou, com o passar dos séculos, em animais extremamente rústicos, com características de boa adaptação ao meio e maior resistência a doenças e parasitas (MORAES et. al. 2009).

A literatura referente ao perfil imunológico dos bovinos em estudo e avaliados por meio de ELISA indireto é escassa, portanto não foram encontrados estudos semelhantes, dificultando a comparação dos resultados obtidos neste trabalho. Essa limitação fez com que os resultados obtidos fossem confrontados com estudos que utilizaram animais de outra raça LABOUCHE (1964). A divergência entre as médias dos valores observados no presente estudo e em outros trabalhos ocorreu devido à interferência de vários fatores inerentes ao animal (raça, idade, sexo, estado fisiológico), metodologia utilizada (diferença entre as técnicas ou antígeno utilizado) e ambiente (manejo, alimentação, época do ano).

## 7 CONCLUSÃO

Os bovinos da raça Curraleiro quando comparados aos animais da raça Nelore apresentaram resposta imune inespecífica e específica humoral para *M. bovis* maior, caracterizada por maior número de leucócitos e superiores concentrações de imunoglobulinas inespecíficas e específicas.

## REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 537p.
2. ABLES, G. P.; NICHIBORI, M.; KANEMAKI, M.; WATANABE, T. Sequence analysis of the NRAMP1 genes from different bovine and buffalo breeds. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v. 64, n. 11, p. 1081-1083, 2002.
3. ABRAHÃO, R. M. C. M; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C.. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
4. ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, Paris, v. 17, n. 1, p. 200-219, 1998.
5. ANDERSSON, L.; DAVIS, C. J. The major histocompatibility complex. In: B.M.L. GODDEERIS, W.I. MORRISON (eds), Cell-mediated immunity in ruminants, Boca Raton, CRC Press, p. 37–57, 1994.
6. ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercule bacilli. Reversal of the unusual nonfusion pattern and observations on the bacterial survival. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 142, p. 1-16, 1975.
7. ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**. 6.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1958. 818p.
8. BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo: Robe, 2003. 583p.

9. BAJENOFF, M.; GRANJEAUD, S.; GUERDER, S. The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 198, p. 715–724, 2003.
10. BALAZS, M.; MARTIN, F.; ZHOU, T.; KEARNEY, J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. **Immunity**, Cambridge, v. 17, p. 341–352, 2002.
11. BALESTIERI, F. M. P. **Imunologia**. Barueri: Manole, 2006. 840p.
12. BARINI, A. C. **Bioquímica sérica de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro de diferentes idades**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
13. BENESI, F. J.; COSTA, J. N.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R. Leucograma padrão de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). Influência de fatores sexuais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 8, n. 1, p. 59-66, 2002.
14. BERGTOLD, A.; DESAI, D. D.; GAVHANE, A.; CLYNES, R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. **Immunity**, Cambridge, v. 23, p. 503–514, 2005.
15. BERNEY, C.; HERREN, S.; POWER, C. A.; GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L.; KOSCO-VILBOIS, M. H. A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 190, p. 851–860, 1999.
16. BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos

- de raças européias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 107-110, 2004.
17. BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow: introduction. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oxford, v. 21, sup. 97, p. 21-27, 1968.
18. BOOM, W. H. The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infections Agents Disease**, New York, v. 5, p. 73-81, 1996.
19. BUTLER, J. E. Bovine immunoglobulins: A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, n. 12, p. 1895-909, 1969.
20. BUTLER, J. E. Bovine immunoglobulins: An augmented review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 4, n. 1-2, p. 43-152, 1983.
21. CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; DIKANIFURA, M.; CARTER, S. D.; AZWAI, S. M.; WRIGHT, E. P. Isolation and characterization of serum immunoglobulin classes of the ostrich (*Struthio camelus*). **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 38, p. 616-620, 1994.
22. CAMARGO, A. H. A. A necessidade de preservar e selecionar o gado crioulo. **Dirigente Rural**, São Paulo, p. 26-31, 1984.
23. CANAVESSI, A. M. O.; CHIACCHIO, S. B.; SARTORI, R.; CURI, P. R. Valores do perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos da raça nelore (*Bos indicus*) criados na região de Botucatu, São Paulo: influência dos fatores etários e sexuais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 9-17, 2000.
24. CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; GUETIÉRREZ CANCELA, M. M.; FORSTER, F.; POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. Lymphocyte subtypes in

- experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesions. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 124, p. 46-51, 2001.
25. CATRON, D. M.; ITANO, A. A.; PAPE, K. A.; MUELLER, D. L.; JENKINS, M. K. Visualizing the first 50 hr of the primary immune response to a soluble antigen. **Immunity**, Cambridge, v. 21, p. 341–347, 2004.
26. CAVANAGH, L. L.; VON ANDRIAN, U. H. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. **Immunology Cell Biology**, Adelaide, v. 80, p. 448–462, 2002.
27. CHO, S.; MEHRA, V.; THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; SERBINA, N.; MAZZACCARO, R.J. ; FLYNN, J. L.; BARNES, P. F.; SOUTHWOOD, S.; CELIS, E.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L.; SETTE. A. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8<sub>T</sub> cells in human tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 97, p. 12210–12215, 2000.
28. COLLARD, A., PIVONT, P., PORTELLE, D. Isolation and purification of bovine immunoglobulins: precipitation steps. **Annales de Recherches Vétérinaires**, Versailles, v. 15, n. 4, p. 497-501, 1984.
29. COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D`ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R. Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos Indicus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 399-403, 2000.
30. COX, G. J. M.; ZAMB, T. J.; BABIUK, L. A. Bovine Herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. **Journal of Virology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 5664-5667, 1993.
31. DANNENBERG, A. M. Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunology Today**, Cambridge, v. 12, p. 228-233, 1991.

- 32.DANNENBERG, A. M. Jr. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Hospital Practice**, New York, v. 28, p. 51-55, 1993.
- 33.DELAMARRE, L.; PACK, M.; CHANG, H.; MELLMAN, I.; TROMBETTA, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. **Science**, London, v. 307, p. 1630–1634, 2005.
- 34.DIETZ, A. B.; DETILLEUX, J. C.; FREEMAN, A. E.; KELLY, D. H.; STABEL, J. R.; KEHRLI, M. E. J. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 400–405, 1997a.
- 35.DIETZ, A. B.; COHEN, N. D.; TIMMS, L.; KEHRLI, M. E. J. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 406–412, 1997b.
- 36.DUNCAN, R. J., PRASSE, K. W. **Clinical pathology**. 4 ed. Athens: Iowa State Press, 2003. 450 p.
- 37.ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 151, p. 577-584, 2000.
- 38.EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, p. 39-52. 2002.
- 39.FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 263-271, 1998.

40. FARR, A. G.; CHO, Y.; DE BRUYN, P. P. The structure of the sinus wall of the lymph node relative to its endocytic properties and transmural cell passage. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 157, p. 265–284, 1980.
41. FELDMAN, B. F.; ZILKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
42. FIFIS, T.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; WOOD, P. R. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 267-274, 1994.
43. FIORAVANTI, M. C. S. ([clorinda@vet.ufg.br](mailto:clorinda@vet.ufg.br)), Bovino Curraleiro Relatório para Registro da Raça. Revisão bibliográfica. Mensagem por LOBO, J. R. ([joycerl@hotmail.com](mailto:joycerl@hotmail.com)). Acesso em: 15 mai. 2008.
44. FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, California, v. 19, p. 93-129, 2001.
45. GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1994. 169 p
46. GARCIA, M.; SERTÓRIO, S. P.; ALVES, G. J.; CHATE, S. C.; CARNEIRO, R.; LALLO, M. A. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunodepressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo. v. 24, n. 3, p. 115-119, 2004.
47. GARSIDE, P.; INGULLI, E.; MERICA, R. R.; JOHNSON, J. G.; NOELLE, R. J.; JENKINS, M. K. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. **Science**, London, v. 281, p. 96–99, 1998.
48. GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K. L.; DRIJFHOUT, J. W.; D'SOUZA, S.; NECKER, A.; HUYGEN, K.; OTTENHOFF, T. H.

- Identification of major epitopes of mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8<sub>T</sub> cells in HLA-transgenic mice and humans. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, p. 6463–6471, 2000.
49. GIBSON, J. P. Role of genetically determined resistance of livestock to disease in the developing world: Potential impacts and researchable issues. In: PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F.; McDERMOTT, K.R.; SONES, K. R.; THORNTON, P. K. Investing in animal health research to alleviate poverty. **International Livestock Research Institute**, Nairobi, v. 13, p. 1-14, 2002.
50. GIBSON, J. P.; BISHOP, S. C. Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: a global approach. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, Paris, v. 24, n. 1, p. 343-353, 2005.
51. GOODNOW, C. C. Chance encounters and organized rendezvous. **Immunology**, Oxford, v. 156, p. 5–10, 1997.
52. GRETZ, J. E.; ANDERSON, A. O.; SHAW, S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. **Immunology**, Oxford, v. 156, p. 11–24, 1997.
53. GRETZ, J. E.; NORBURY, C. C.; ANDERSON, A. O.; PROUDFOOT, A. E.; SHAW, S. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 192, p. 1425–1440, 2000.
54. HAAGSMA, J. **Bovine tuberculosis**. OIE Manual (Amendment), 1995, 11p.
55. ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. Antigen presentation to naïve CD4 T cells in the lymph node. **Nature Immunology**, New York, v. 4, p. 733–739, 2003.

56. JACOB, J.; KASSIR, R.; KELSOE, G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 173, p. 1165–1175, 1991.
57. JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. 989p
58. JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, P. T. M.; SHLOMCHIK, M. S. **Imunologia – o sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Atmed, 2007. 824p.
59. JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e imunológicos de bovinos da raça Curraleiro**. 2006. 107f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
60. LABOUCHE, C. La protéinémie chez la vache. **Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 17, p. 721-745, 1964.
61. LEAL, M. L. R.; BENESI, F. J.; LISBÔA, J. A. N.; COELHO, C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. Proteinograma sérico de bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 40, p. 138-145, 2003.
62. KANEKO, J. J.; HARHEY, I. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
63. KELSOE, G. Life and death in germinal centers (redux). **Immunity**, Cambridge, v. 4, p. 107–111, 1996.
64. KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana de origem bovino y salud pública. **Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Epizooties**, Paris, v. 3, n. 1, p. 55-76, 1984.

65. LYASHCHENKO, K. P.; POLLOCK, J. M.; COLGANGELI, R.; GENNARO, M. L. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 5344-5349, 1998.
66. LYASHCHENKO, K.; WHELAN, A. O.; GREENWALD, R.; POLLOCK, J. M.; ANDERSEN, P.; HEWINSON, R. G.; VORDERMEIR, H. M. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M bovis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 2462-2467, 2004.
67. LYASHCHENKO, K. P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; OLSEN, J. H.; BALL, R.; DUMONCEAUX, G.; DUNKER, F.; BUCKLEY, C.; RICHARD, M.; MURRAY, S.; PAYEUR, J. B.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J. M.; MIKOTA, S.; MILLER, M.; SOFRANKO, D.; WATERS, W. R. Tuberculosis in elephants: antibody responses to defined antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis and monitoring of treatment. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, p. 722–732, 2006.
68. MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, London, v. 303, p. 1662–1665, 2004.
69. MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Departamento de Defesa Animal. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose (PNCEBT)**. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 out. 2009.
70. MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 1, p. 223-235, 2002.

71. MARTINEZ-POMARES, L.; KOSCO-VILBOIS, M.; DARLEY, E.; TREE, P.; HERREN, S.; BONNEFOY, J. Y.; GORDON, S. Fc chimeric protein containing the cysteine-rich domain of the murine mannose receptor binds to macrophages from splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus and to germinal centers. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 184, p. 1927–1937, 1996.
72. MAZZACCARO, R.J.; GEDDE, M.; JENSEN, E. R.; VAN SANTEN, H. M.; PLOEGH, H. L.; ROCK, K. L.; BLOOM, B. R. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 93, p. 11786–11791, 1996.
73. McNAIR, J.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MACKIE, D. P.; POLLOCK, J. M. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 53, p. 365-371, 2001.
74. MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994.
75. MORAES, J. M.; BRITO, L. A. B.; DE MOURA, V. M. B. D.; RIBEIRO, C. S.; GUIMARÃES, V. Y.; ANDRADE, D. F.; LOBO, J. R.; FIORAVANTI, M. C. S. Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça Curraleiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 339-344, 2009.
76. NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, Edinburg, v. 81, p. 79-86, 2001.
77. NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amesterdam, v. 10, p. 41-52, 1994.

78. NOL, P.; LYASHCHENKO, K. P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; NONNECKE, B. J.; KEEFE, T. J.; THACKER, T. C.; RHYAN, J. C.; ALDWELL, F. E.; SALMAN, M. D.. Humoral Immune Responses of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and Experimental Challenge with *M. bovis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 3, p. 323–329, 2009.
79. NOSSAL, G. J. Life, death and immune system. **Science Animal**, Gainesville, v. 269, n. 3, p. 52-62, 1993.
80. OKADA, T.; MILLER, M. J.; PARKER, I.; KRUMMEL, M. F.; NEIGHBORS, M.; HARTLEY, S. B.; O’GARRA, A.; CAHALAN, M. D., CYSTER, J. G. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. **PLoS Biology**, New York, v. 3, n. 6, p. 1047-1061, 2005.
81. O’REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. **Tubercule and Lung Disease**, Edinburgh, v. 1, p. 1-46, 1995.
82. PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, p. 181-190, 2006.
83. PAPE, K. A.; KOUSKOFF, V.; NEMAZEE, D.; TANG, H. L.; CYSTER, J. G.; TZE, L. E.; HIPPEN, K. L.; BEHRENS, T. W.; JENKINS, M. K. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 197, p. 1677–1687, 2003.
84. PAPE, A. K.; CATRON, D. M.; ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble

- antigen directly in the follicles. **Immunity**, Cambridge, v. 26, p. 491-502, 2007.
85. PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; PARK, J. Y.; MOON, J. S.; KIM, S. H.; KWON, N. H.; AHN, J. S.; DAVIS, W. C. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 5, p. 29–39, 2004.
86. PASHMI, M.; QANBARI, S.; GHORASHI, S. A.; SHARIFI, A. R.; SIMIANER, H. Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles, somatic cell count and milk traits in iranian holstein population. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 126, p. 296–303, 2009.
87. PAULA NETO, J. B. **Hemogramas de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro de diferentes idades, machos e fêmeas, gestantes e não gestantes**. 2004. 65f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
88. PIERCE, A. E. Electrophoretic and immunological studies on sera from calves from birth to weaning. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 53, p. 247-260, 1955.
89. POLLOCK, J. M.; McNAIR, J.; WELSH, M. D.; GIRVIN, R. M.; KENNEDY, H. E.; MACKIE, D. P.; NEILL, S. D. Immune responses in bovine tuberculosis, **Tubercule**, Edinburgh, v. 81, p. 103-107, 2001.
90. POLLOCK, J. M.; NEILL, D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, London, v. 163, p. 115-127, 2002.
91. POLLOCK, J. M.; RODGERS, J. D.; WELSH, M. D.; McNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, p. 141-150, 2006.

92. POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D.; McNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam. v. 108, n. 2, p. 37-43, 2005.
93. PRIMO, A T. El ganado bovino ibérico em las américas 500 años despues. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 41, p. 421-432, 1992.
94. PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 188-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 99, p. 357-399, 1988.
95. QI, H.; EGEN, J. G.; HUANG, A. Y.; GERMAIN, R. N. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. **Science**, London, v. 312, p. 1672–1676, 2006.
96. RITACCO, V.; LOPEZ, B.; de KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A.; Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 50, p. 365-367, 1991.
97. ROITT, I. **Imunologia**. 7. ed. São Paulo: Editora Manole, 2003, 481p.
98. ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 91-97, 1996.
99. ROXO, E. 2004. **Situação atual da tuberculose bovina no Brasil**. <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras%20%20resumos/Eliana%20Roxo> .doc. Disponível em: 31/10/2009
100. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007, 265p.

101. SANTIN, A. P. I. **Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica.** 2008. 92f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
102. SEVELIUS, E.; ANDERSSON, M. Serum protein eletrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. **Veterinary Record**, London, v. 137, p. 667, 1995.
103. SILVA, E. B.; FIORAVANTI, M. C. S.; SILVA, L. A. F.; ARAÚJO, E. G.; MENEZES, L. B. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2191-2196, 2008a.
104. SILVA, R. O. P.; LOPES, A. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008b.
105. SIXT, M.; KANAZAWA, N.; SELG, M.; SAMSON, T.; ROOS, G.; REINHARDT, D. P.; PABST, R.; LUTZ, M. B.; SOROKIN, L. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. **Immunity**, Cambridge, v. 22, p. 19–29, 2005.
106. STEAD, W. W. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection?. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 95, p. 729-745, 1967.
107. STEAR, M. J.; BISHOP, S. C.; MALLARD, B. A.; RAADSMA, H. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. **Research in Veterinary Science**, London, v. 71, p. 1–7, 2001.

108. STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2001, 408p.
109. SUETAKE, H.; RATAN SAHA, N.; ARAKI, K.; AKATSU, K.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Lymphocyte surface marker genes in fugu. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Londres, Part D, v. 1, n. 1, p. 102 – 108, 2006.
110. TIZARD, I. **Imunologia veterinária – uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Editora Roca. 2002, 532p.
111. THOM, M.; MORGAN, J. H.; HOPE, J. C.; VILLAREAL-RAMOS, B.; MARTIN, M.; HOWARD, C. J. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amhers, v. 102, n. 4, p. 399-412, 2004.
112. VAN CREVEL, R.; TOM, H. M. OTTENHOFF.; JOS, W. M.; MEER, V. D. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.
113. VAN EWIJK, W.; BREKELMANS, P. J.; JACOBS, R.; WISSE, E. Lymphoid microenvironments in the thymus and lymph node. **Scanning Microscopy**, Chicago, v. 2, p. 2129–2140, 1988.
114. VELLOSO, L. Evolução e tendências da pecuária bovina de corte no Brasil, Produção de novilho de corte In: SIMPOSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4, 1996, Piracicaba, Anais..., Piracicaba, FEALQ, 1996. p. 1-40.
115. VIANA, U. Sobre o gado Curraleiro, notas históricas e apontamentos sobre os bovinos no Brasil. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, 1927, 41p.

116. VINUESA, C. G.; TANGYE, S. G.; MOSER, B.; MACKAY, C. R. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 5, p. 853–865, 2005.
117. WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 133, n. 4, p. 223-234, 2005.
118. WARNER, C. M.; MEEKER, D. L.; ROTHSCHILD, M. F. Genetic control of immune responsiveness: a review of its use as a tool for selection for disease resistance. **Journal of Animal Science**, Tokyo, v. 64, p. 394-406, 1987.
119. WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; WHIPPLE, D. L. *Mycobacterium bovis*-infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): detection of immunoglobulin specific to crude mycobacterial antigens by ELISA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 14, p. 470–475, 2002.
120. WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; BANNANTINE, J. P.; WHIPPLE, D.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; ANDERSEN, P.; MCNAIR, J.; POLLOCK, J. M.; LYASHCHENKO, K. P. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, p. 849–855, 2004.
121. WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; BANNANTINE, J. P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; ANDERSEN, P.; MCNAIR, J.; POLLOCK, J. M.; LYASHCHENKO, K. P. Antibody responses in reindeer (*Rangifer tarandus*) infected with *Mycobacterium bovis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 12, p. 727–735, 2005.

122. WATERS, W. R., PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; BANNANTINE, J. P.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; MCNAIR, J.; POLLOCK, J. M.; ANDERSEN, P.; LYASHCHENKO, K. P. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, p. 648–654, 2006.
123. WELSH, M. D.; CUNNINGHAM, R. T.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MCNAIR, J.; SKUCE, R. A.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, Oxford, v. 114, p. 101-111, 2005.
124. WESTTHUSIN, M. E.; SHIN, T.; TEMPLETON, J. W.; BURGHARDT, R. C.; ADAMS, L. G. Rescuing valuable genomes by animal cloning: a case for natural disease resistance in cattle. **Journal of Animal Science**, Tokyo, v. 85, p. 138-142, 2007.

