

Dosagem de lisozima para avaliação da resposta imune em bezerros

Lysozyme as an indicator of the immune response in calves

Maurício Garcia,* Sabrina Caruso Chate,* Ana Carolina Rusca Porto,* Yara Ferreira Figueira,* André Dias Dieguez,* Flávia Corbari Feres,* Maria de Fátima Monteiro Martins*

Resumo

O presente trabalho visou verificar a eficiência da dosagem de lisozima como indicador de imunidade em bovinos, valendo-se de animais naturalmente acometidos de processo diarréico. Para tanto, foram utilizados bezerros com até três meses de idade, criados em manejo semi-intensivo e divididos em três grupos experimentais (I – sem diarreia, II – com diarreia mas sem sintomas sistêmicos, III – com diarreia e sintomas sistêmicos). Foram colhidas amostras sanguíneas de cada animal, que foram processadas para a realização da dosagem de gamaglobulinas por eletroforese, dosagem de IgG por imunodifusão radial, contagem de linfócitos e dosagem de lisozima. Os resultados encontrados mostraram existir linfopenia nos animais do grupo III, mas não foi verificada hipogamaglobulinemia na eletroforese ou na imunodifusão radial. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no nível de lisozima entre os grupos estudados. Não foi possível demonstrar correlação entre a dosagem de lisozima e os outros indicadores preconizados no presente experimento. Todavia, embora no presente experimento não se tenha encontrado uma correlação positiva entre o teor de lisozima e parâmetros de resposta imunitária, os resultados obtidos sugerem que novos trabalhos devam ser realizados para que tal parâmetro seja validado como indicador biológico.

Palavras-chave: lisozima, resposta imune, bezerros.

Abstract

The purpose of this work was to evaluate the serum lysozyme concentration as an indicator of immune response in bovine, considering naturally affected animals with diarrheic process. The experiment was conducted using 3 months old calves, raised in semi-intensive system and allocated into 3 groups with 10 animals each one (I - no diarrhea, II – diarrhea but no systemic symptoms, III – diarrhea and systemic symptoms). Blood samples were collected from each animal and processed by electrophoresis to verify the gamma-globulin content. The IgG was measured by radial immunodiffusion. Other measurements included blood lymphocyte count and serum lysozyme concentration. The results showed lymphopenia in animals of group III, but no differences were found in gamma-globulin content, as measured by electrophoresis and radial immunodiffusion. No differences were found in the lysozyme content in all groups analyzed and it was not possible to demonstrate a correlation between the lysozyme content and the other indicators studied in this experiment. However, although it was not found this positive correlation, the results suggest that new works have to be performed to validate this parameter as a biological indicator.

Keywords: lysozyme, immune response, calves.

Introdução e literatura

Com a popularização da pecuária orgânica no mercado nacional e mundial (Campanhola e Valarini, 2001), a atenção do consumidor está cada vez mais voltada para produtos com limitado uso de defensivos e produtos químicos. Para conseguir isso, a melhor maneira é a prevenção das doenças, onde a manutenção da saúde dos animais é de importância pri-

mordial para que possam, com suas próprias defesas, se privar de moléstias comuns na criação (Burton e Erskine, 2003). Neste sentido, o estudo do sistema imune dos ruminantes é de extrema valia, porém ainda carecem estudos mais aprofundados que visem, nesta espécie, estabelecer concretamente modelos experimentais de avaliação da resposta imunitária (Garcia et al., 1999).

* Universidade Paulista – UNIP

Maurício Garcia e-mail: mgar@mgar.vet.br; Sabrina C. Chate e-mail: sabinavet@ig.com.br; Ana Carolina Rusca Porto e-mail: carolinavet@zipmail.com.br; Yara Ferreira Figueira e-mail: yaravet@zipmail.com.br; André Dias Dieguez e-mail: andre_dias_dieguez@hotmail.com; Flávia Corbari Feres e-mail: flaviaferes@hotmail.com; Maria de Fátima M. Martins e-mail: fa3m@terra.com.br;

Endereço para correspondência: Rua Enjolras Vampré, 146 – São Paulo, SP – CEP 04290-070

Uma forma de se avaliar a resposta imune que tem sido muito empregada consiste na determinação da concentração de anticorpos no soro. Diversas técnicas são preconizadas para tanto, como a eletroforese, a imunoeletroforese, a imunodifusão radial e a turbidimetria com sulfato de zinco (Satterfield e Rourke, 1981). Entretanto, Bittar et al. (2004) comentam que a imunidade protetora não está diretamente relacionada com os níveis de anticorpos porque os anticorpos totais são produzidos tanto contra antígenos do parasita quanto contra antígenos do hospedeiro, como resultado de resposta inflamatória. Portanto, para a avaliação da eficácia do sistema imune, deveriam ser utilizados testes específicos para a análise das respostas humoral e celular.

Uma outra técnica para a avaliação da resposta imune é a quantificação das subpopulações linfocitárias existentes na circulação sanguínea através da identificação de marcadores específicos (Wyckoff et al., 1993; Garcia et al., 1994). A contagem de linfócitos, porém, oferece apenas uma idéia quantitativa destas células e nada diz a respeito da sua função ou da sua atividade. Ora, um animal pode ter uma quantidade adequada de linfócitos, mas tais linfócitos podem estar inativos. Uma alternativa para se determinar se linfócitos estão ativos é avaliar sua capacidade de multiplicação em cultivos celulares, já que a multiplicação dos linfócitos é fundamental para uma boa resposta imune. A técnica mais comum para a avaliação da capacidade de multiplicação de linfócitos *in vitro* é chamada blastogênese ou estimulação mitogênica (Fitzpatrick et al., 1992; Otto et al., 1993; Lonneux et al., 1998). Todavia, é uma técnica de difícil execução, exige aparelhagem sofisticada e freqüentemente emprega marcadores radioativos que só podem ser manipulados por laboratórios devidamente estruturados.

Diante disso, muitos autores têm dado preferência para técnicas de avaliação *in vivo* da resposta imune. No caso da resposta humoral, a técnica de eleição consiste na inoculação prévia de um determinado antígeno e posterior mensuração da produção de anticorpos contra este determinado antígeno (Fitzpatrick et al., 1992; Pollock et al., 1992; Garcia et al., 1994; Garcia et al., 2003a).

Já no caso da resposta celular, a reação cutânea de hipersensibilidade tardia foi escolhida por muitos autores como modelo de sua avaliação. Trata-se de uma técnica de simples realização que consiste em se aplicar um determinado antígeno no tecido intradérmico. Caso o animal tenha sido previamente sensibilizado a este antígeno, irá se formar uma reação que poderá ser avaliada medindo-se a espessura da sua pele antes e depois da reação, usando-se um paquímetro (Cheville et al., 1993; Reddi et al., 1981; Garcia et al., 1994).

Ao lado de todas essas técnicas, está a dosagem de lisozima, descrita como indicador de imunidade no homem e em vários outros animais (Osserman e Lawlor, 1966; Bonizzi et al., 1989; Ponti et al., 1989). A lisozima é uma enzima antibacteriana presente nos tecidos e em todos os fluidos corpóreos, exceto no fluido cerebrospinal, suor e urina (Brightman et al., 1991). A lisozima divide os peptídeos glicocianos que compõem a parede celular das bactérias gram-positivas. Ela também destrói algumas bactérias gram-negativas em conjunto com complemento.

A lisozima é encontrada em altas concentrações nos lisossomos dos neutrófilos e se acumula nas áreas de inflamação aguda, incluindo os locais de invasão bacteriana. Ela também é sintetizada na mucosa gástrica e nos macrófagos dentro da mucosa intestinal. Como o resultado é encontrado em grandes quantidades no fluido intestinal. O pH ideal para atividade da lisozima, embora seja um pouco baixo (pH de 3 a 6) é facilmente obtido nos locais inflamatórios, bem como dentro dos fagossomos. A lisozima também é uma opsonina potente, facilitando a fagocitose na ausência de anticorpos específicos e sob condições nas quais a sua atividade enzimática possa ser ineficaz. A lisozima também é capaz de destruir vários vírus (Tizard, 1998).

Apesar dessas propriedades, são muito raros os trabalhos internacionais que utilizem a dosagem de lisozima para a avaliação do sistema imune. Brightman et al. (1991) estudaram a concentração de lisozima na lágrima de bezerros, cabras e ovelhas. Os autores detectaram que a lisozima só está presente nas lágrimas de cabras e ovelhas, e não de bezerros. Já Berneri et al. (1991) usaram a técnica para comparação da evolução de vacinas específicas de imunomoduladores no controle de doenças de bezerros de corte. Riedel e Schmidt (1991), estudando a influência de leucócitos no colostro no sistema imune de bezerros neonatos, utilizaram a técnica de dosagem de lisozima e provaram a presença da enzima no colostro. Outros estudos foram feitos para demonstrar a presença de lisozima no leite (Piccinini et al., 1999) e a eficácia da enzima na resistência a mastite (Seyfert et al., 1996). Bonizzi et al. (1989), estudando a caracterização de alguns parâmetros de imunidade não-específica em bezerros de leite, observaram haver um aumento da concentração de lisozima sanguínea na primavera.

No Brasil, Garcia et al. (2002) realizaram um estudo preliminar empregando a lisozima como indicador de imunidade em ovinos. Neste estudo foram utilizados seis carneiros adultos, dos quais foram colhidas amostras sanguíneas diariamente, por um período de oito dias, totalizando 48 amostras. As provas utilizadas foram: dosagem de gamaglobulinas por eletroforese, dosagem de lisozima e contagem leucocitária. A contagem de linfócitos, quando confrontada com a dosagem de lisozima, apresentou uma correlação positiva de 11%, valor não significante estatisticamente. Já a dosagem de gamaglobulinas apresentou uma correlação positiva de 37%, valor estatisticamente significante. Os resultados deste trabalho indicam existir uma correlação entre os valores de lisozima e a concentração de gamaglobulinas no soro. Em um estudo posterior, todavia, os autores não conseguiram reproduzir tais resultados em condições de imunossupressão experimental (Garcia et al., 2003b).

Objetivo

A análise da literatura disponível mostra a carência de trabalhos sobre o uso de lisozima como parâmetro para avaliação da resposta imunitária em bovinos. Como se trata de uma técnica simples e acessível, ao contrário de várias outras técnicas empregadas com esse fim, a principal motivação deste trabalho foi dar uma contribuição para essa questão, estudando a eficiência da dosagem de lisozima como indicador de imunidade, em um modelo baseado na diarreia de ocorrência natural em bezerros.

Materiais e métodos

Estabelecimento dos grupos de estudo e coleta do material

Foram utilizados 30 bezerros com idade de até três meses, criados em uma propriedade leiteira de manejo semi-intensivo, divididos em três grupos com 10 animais cada, de acordo com sua condição clínica frente à diarreia, adotando-se o protocolo especificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação da condição dos animais conforme os achados clínicos durante exame

Condição do animal	Achados clínicos
I	Sem diarreia
II	Com diarreia e sem sintomatologia sistêmica (temperatura inferior a 39,5°C, normorexia e sem prostração)
III	Com diarreia e sintomatologia sistêmica (temperatura superior a 39,5°C ou anorexia ou prostração)

De cada animal foi coletada uma amostra de sangue, em tubos a vácuo (Vacutainer, Becton), com e sem anticoagulante. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o laboratório, sendo que os tubos sem anticoagulante foram para centrifuga para extração de soro e posteriormente separados em alíquotas.

Dosagem de gamaglobulinas por eletroforese

A percentagem de gamaglobulinas foi estimada através da eletroforese de proteínas séricas em gel de agarose, segundo Barta e Pourciau (1984). Foram colocados na cuba de eletroforese 190mL de tampão barbital 0,05m e de pH 8,5. No filme de agarose (Celm gel, filme de agarose gel – código 0716) foram aplicados 0,6 µL de soro com o uso de micropipeta específica. Em seguida, esse filme foi colocado na tampa com a porção onde foi aplicada a amostra do lado do pólo negativo da tampa. A tampa foi colocada sobre a cuba e a corrida foi iniciada com a duração de 35 minutos a 90 volts. Ao término da corrida, a tampa foi retirada e o excesso de tampão das bordas do filme foi eliminado. O filme foi retirado da tampa e mergulhado em 200mL de negro de amido 0,2% ácido acético a 5%, por 5 minutos. Após essa etapa, o filme foi mergulhado em 200mL de ácido acético 5% também por 5 minutos. Na seqüência, o excesso de ácido acético foi retirado e o filme foi mantido à temperatura de 60°C para secagem. Em seguida, foi novamente colocado no ácido acético 5% até o fundo ficar transparente, quando foi seco novamente a 60°C. Ao final o filme foi lido em densitômetro (DS 50, Celm) a 520mm.

O valor percentual de gamaglobulinas foi multiplicado pelo valor obtido na dosagem de proteínas totais, para se obter o valor absoluto. Para a determinação da quantidade total de proteína foi empregado o método do biureto, conforme des-

crito por Weichselbaum (1946), utilizando-se um *kit* comercial para dosagem de proteínas (Labtest) e procedendo a leitura em analisador eletrônico (Quicklab).

Dosagem de IgG por imunodifusão radial

Foi feita a dosagem de IgG através da técnica de imunodifusão radial (IDR), de acordo com a descrição de Mancini et al. (1965), usando *kit* comercial para dosagem de IgG (Binding Site, RN200. 3 e RN360. 3).

Contagem de linfócitos

A contagem de linfócitos foi obtida multiplicando-se o valor da contagem total de leucócitos, obtido em equipamento eletrônico (CELM, modelo CC530), pela contagem diferencial obtida em extensão sangüínea.

Dosagem de lisozima

A técnica utilizou 20mg de uma cepa liofilizada de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, cód. M3770) suspensa em 0,6 mL de solução fisiológica, conforme descrito por Bonizzi et al. (1989). Essa suspensão foi adicionada a 40 mL de agarose a 1% em tampão fosfato 1/15 M, pH 6,3 (22,1 mL de Na₂HPO₄ · 2H₂O 1/15M e 77,9 mL de KH₂PO₄ 1/15 M). Após a solidificação do gel, foram feitos poços de 5mm de diâmetro distantes de 3cm um do outro. Os poços foram preenchidos com 0,05 mL do soro a ser testado. A leitura da placa foi feita após a incubação a 24°C por 18 horas e consistiu da medida da área do halo de lise bacteriana ao redor dos poços, calculada a partir do diâmetro do mesmo.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância e estudos de correlação (Zar, 1996), para um valor de p<0,05. Foi empregada planilha eletrônica comercial (Excel 97, Microsoft) de acordo com as recomendações de Dretzke e Heilman (1998).

Resultados

Os resultados dos parâmetros imunológicos estudados estão expostos na tabela 2 e os testes de correlação se encontram na Tabela 3.

Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros imunológicos em bezerros saudáveis (Grupo I), diarréicos (Grupo II) e diarréicos com sintomatologia sistêmica (Grupo III).

Parâmetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	(n=10)	(n=10)	(n=10)
Linfócitos sangüíneos (céls. /µL)	10.310 ^a	9.912 ^{ab}	7.801 ^b
Gamaglobulinas séricas (g/dL)	1,67 ^a	1,52 ^a	2,10 ^a
IgG séricas (g/dL)	2,79 ^a	2,72 ^a	3,71 ^a
Lisozima sérica (área de lise mm ²)	85,8 ^a	87,5 ^a	80,4 ^a

^a letras iguais indicam valores estatisticamente iguais (na mesma linha)

Tabela 3 – Correlação entre a dosagem de lisozima sérica e outros parâmetros de imunidade em bezerros (n = 30)

Correlação	Valor
Lisozima x Linfócitos	24,5% (ns)
Lisozima x Gamaglobulinas	-11,1% (ns)
Lisozima x IgG	6,5% (ns)

ns = correlação estatisticamente não significativa (p>0,05)

Discussão

Encontrar um marcador de imunidade em bovinos, de baixo custo e fácil execução pode representar um grande avanço no controle de várias doenças e uma forma de estabelecer embasamento científico para diversos procedimentos ligados à pecuária orgânica, modalidade de crescente interesse no cenário brasileiro e mundial. Todavia, a grande maioria dos experimentos que se valem de modelos de mensuração da resposta imune está relacionada com pesquisa de base ou em humanos, onde os recursos são mais abundantes e permitem utilizar técnicas mais sofisticadas, como a estimulação blastogênica de linfócitos, as dosagens de linfocinas e a citometria de fluxo.

Tais técnicas, todavia, são inacessíveis para as condições brasileiras de pesquisa de campo com bovinos e a busca de alternativas cientificamente adequadas e economicamente viáveis foi uma das principais motivações que levou os autores deste trabalho a pesquisar a dosagem de lisozima, uma técnica simples, barata e de fácil execução.

Para avaliar esse parâmetro, havia a necessidade de se comparar a dosagem de lisozima em animais imunossuprimidos com aquela encontrada em animais de um grupo controle. Ao invés de se optar por animais imunossuprimidos experimentalmente, como foi feito em outro trabalho de nosso grupo, em ovinos (Garcia et al., 2003b), neste projeto optou-se por escolher animais naturalmente imunossuprimidos. Assim, a escolha de animais diarréicos teve esse propósito, ou seja, partiu-se do princípio que animais nestas condições estariam imunossuprimidos por efeito de seu quadro clínico. Essa hipótese (diarréia e imunossupressão) foi baseada em vários estudos que demonstraram essa associação, como ocorre em Gudapty e Atluru (1992) e Brum et al. (2002). Segundo Roth et al. (1981), que trabalharam com o vírus da diarréia bovina, a imunossupressão é advinda da infecção aguda e estaria relacionada com uma disfunção leucocitária. Pernthaler et al. (1997) admitem também ocorrer trombocitopenia e Adler et al. (1996) descrevem decréscimo no fator de necrose tumoral alfa. Feitosa et al. (2001) demonstram que a taxa média de IgG em bezerros que vieram a óbito nos três primeiros meses de vida foi menor que aquela encontrada nos animais que sobreviveram.

Em outras palavras, há evidências suficientes na literatura que permitem supor que animais diarréicos estariam imunossuprimidos. Ainda assim, neste trabalho procuramos nos assegurar da questão, através da contagem linfocitária, sendo encontrada uma linfopenia no grupo que apresentava diarréia associada a sinais sistêmicos, fato que reforça a suposição de que estavam com sua imunidade comprometida. Entretanto, nesses animais não foi demonstrada a ocor-

rência de hipogamaglobulinemia, quer por eletroforese, quer por imunodifusão radial. Esses resultados sugerem que o nível global de anticorpos séricos pode não ser um bom indicador de imunossupressão, fenômeno também encontrado por Silva et al. (2001) e comentado por Bittar et al. (2004).

Desta forma, cabe salientar que este artigo não é um trabalho sobre diarréia, é sobre imunidade, e a diarréia serviu apenas como modelo experimental para se ter um grupo de animais imunossuprimidos. Assim, de posse desse grupo, especialmente os animais do grupo III, precisávamos então comparar os resultados da dosagem de lisozima com aqueles encontrados no grupo I (controle). Todavia, não houve diferenças significantes entre os resultados desses grupos. Além disso, não foi possível demonstrar haver correlação estatisticamente significativa entre a dosagem de lisozima e outros indicadores, como a contagem de linfócitos, a dosagem de gamaglobulinas e a dosagem de IgG.

A ausência dessa diferença contrasta dramaticamente com os resultados apresentados por Bonizzi et al. (1989) e Ponti et al. (1989), que empregaram a lisozima para analisar a imunidade inespecífica em bovinos de leite e de corte, respectivamente. A dosagem de lisozima foi também correlacionada por esses autores com outros parâmetros como dosagem de proteínas séricas, dosagem de imunoglobulinas, dosagem de complemento, atividade bactericida do soro e estimulação blastogênica de linfócitos.

O que chama a atenção, todavia, é o fato de ambos os trabalhos serem de pesquisadores do mesmo grupo italiano e não existirem resultados semelhantes em pesquisadores de outros grupos. O que se nota, na verdade, é uma linha de pesquisa desse grupo, consistente com esses resultados, e que se repete em outros artigos, como é o caso de Archetti et al. (1996), Amadori et al. (1997) e Bonizzi et al. (2003).

No que se refere a resultados por nós encontrados previamente (Garcia et al., 2002), cabe ressaltar que foi realizado com ovinos sem imunossupressão e se tratou de um ensaio preliminar onde foi encontrada apenas correlação entre a dosagem de lisozima e a dosagem de gamaglobulinas, parâmetro que, conforme citado anteriormente, não pode ser considerado como um indicador seguro de imunossupressão. Tais resultados não foram corroborados em experimento posterior (Garcia et al., 2003b), em que a dosagem de lisozima foi avaliada em ovinos experimentalmente imunossuprimidos com ciclofosfamida. Nesta segunda vez, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Ficam, desta forma, abertas algumas questões. Novos experimentos precisam ser conduzidos para avaliar por que motivo não foi possível reproduzir os achados dos pesquisadores italianos e também para analisar o comportamento da lisozima em condições de imunossupressão experimental em bovinos.

Conclusões

Nas condições realizadas no presente experimento, a dosagem de lisozima sérica não se mostrou um indicador eficiente de imunidade em bezerros. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no nível de lisozima entre os grupos estudados e não foi possível demonstrar

correlação entre a dosagem de lisozima e os outros indicadores. Todavia, embora no presente experimento não se tenha encontrado uma correlação positiva entre o teor de lisozima e

parâmetros de resposta imunitária, os resultados obtidos sugerem que novos trabalhos devam ser realizados para que tal parâmetro seja validado como indicador biológico.

Referências

- ADLER, H.; JUNGI, T. W.; PFISTER, H.; STRASSER, M.; SILEGHEM, M.; PETERHANS, E. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *Journal of Virology*. v. 70, n. 4, p. 2650-2653, 1996.
- AMADORI, M.; ARCHETTI, I. L. FRASNELLI, M. et al. An immunological approach to the evaluation of welfare in Holstein Friesian cattle. *Journal of Veterinary Medicine [B]*, v. 46, n. 6, p. 321-327, 1997.
- ARCHETTI, I. L.; AMADORI, M.; FRASNELLI, M. et al. Determinazioni chimico-cliniche a carattere predittivo su bovini di razza frisone. In: CONGRESSO DELLA SOCIETÀ ITALIANA DELLE SCIENZE VETERINARIE, 44., *Proceedings...* 1996, p. 317-318.
- BARTA, O.; POURCIAU, S. S. Electrophoresis. In: BARTA, O. *Laboratory Techniques of Veterinary Clinical Immunology*. Illinois: Charles C. Thomas, 1984. p. 116-122.
- BERNERI, C.; AMADORI, M.; CECCARELLI, A.; GUADAGNINI, P. F.; BOLZANI, E. Comparative evaluation of specific vaccines and immunomodulators in disease control of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v. 38, n. 1, p. 60-77, 1991.
- BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V. et al. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 1, p. 107-110, 2004.
- BOGDANOV, M.; KUSNEDELICHEVA, S. Chemical and hematologic studies of sheep before and after treatment with cyclophosphamide. *Vet Med Naikin*. v. 14, n. 5, p. 87 - 91, 1977.
- BONIZZI, L.; AMADORI, M.; MELEGARI, M.; PONTI, W.; CECCARELLI, A.; BOLZANI, E. Characterization of some parameters of non-specific immunity in dairy cattle (I). *Journal of Veterinary Medicine Series B*. v. 36, n. 5, p.365-373, 1989.
- BONIZZI, L.; MENANDRO, M. L.; PASOTTO, D.; LAUZI, S. Transition Cow: Non-specific Immune Response. *Veterinary Research Communications*, v. 27 (suppl.), p. 137-142, 2003.
- BRIGHTMAN, A. H.; WACHSSTOCK, R. S.; ERSKINE, R. Lysozyme concentration in the tears of cattle, goats, and sheep. *American Journal of Veterinary Research*. v. 52, n. 1, p. 9-11, 1991.
- BRUM, M. C. S.; SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F. et al. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da diarréia viral bovina tipo 2 (BVDV-2). *Ciência Rural*, v. 32, n. 5, p. 813-820, 2002.
- BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. v. 19, n. 1, p. 1-45, 2003.
- CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, Brasília, v. 18, n. 3, p. 69-101, 2001.
- CHEVILLE, N. F. et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *American Journal of Veterinary Research*. v. 54, n. 10, p.1591-1597, 1993.
- DRETZKE, B. J.; HEILMAN, K. A. *Statistics with Microsoft® Excel*. New Jersey: Practice Hall, 1998. 164 p.
- FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H.; CIARLINI, P. C.; MENDES, C. N.; PERRI, S. H. V. Transferência de imunidade passiva colostrálica e a morbidade e mortalidade de bezerros neonatos. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*. v. 4, n. 2, p. 9-15, 2001.
- FITZPATRICK, J. L. et al. Comparison of antibody and cell-mediated immune responses in horses following feeding of a novel dietary antigen, ovalbumin, and rotavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 34, p. 245-257, 1992.
- GARCIA, M.; BASTOS, P. A. S.; VERENGUER, M. E. G.; BENETONE, M. Z.; PECÊGUINI, W. P.; GUERRA, J. L. The immune response in Bovine leukemia virus-infected cattle. *Indian Journal of Dairy Science*. v. 47, n. 9, p. 545-550, 1994.
- GARCIA, M.; KITAMURA, S. S.; RABELLO, P. A.; FARIA JR., S. P. F.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SILVA, M. M.; BASTOS, P. A. S.; RAMOS, M. C. C.; CARVALHO, V. M. Modelo experimental para avaliação da resposta imune em ovinos. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista*, v. 17, n. 1, p. 19-26, 1999.
- GARCIA, M.; ALVES, G. J.; CARNEIRO, R.; CHATE, S. C.; FIGUEIRA, Y. F.; PORTO, A. C. R. Estudo preliminar da dosagem de lisozima para avaliação da resposta imune em ovinos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 10., 2002, Paysandu. *Anais...*Montevideo: Sociedade Uruguia de Buiatria, 2002. p. 281-284.
- GARCIA, M.; CHATE, S. C.; PORTO, A. C. R.; FIGUEIRA, Y. F.; DIEGUEZ, A. D.; FERES, F. C.; MARTINS, M. F. M. Comparação do uso dos antígenos brucélicos convencionais e tamponado para avaliação experimental da resposta imune humoral em ovinos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11., 2003, Salvador. *Anais...* Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003a. p. 18.
- GARCIA, M.; CHATE, S. C.; PORTO, A. C. R.; FIGUEIRA, Y. F.; DIEGUEZ, A. D.; FERES, F. C.; MARTINS, M. F. M. Dosagem de lisozima para avaliação da resposta imune em ovinos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11., 2003, Salvador. *Anais...* Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003b. p. 18.
- GUDAPTY, S.; ATLURU, D. In vitro interactions of 15-lipoxygenase metabolite(s) of arachidonic acid and bovine viral diarrhoea virus, in mitogen stimulated bovine mononuclear cells *Biochemical Archives*. v. 8, n. 4, p. 363-368, 1992.
- LONNEUX, J. F. et al. Humoral and cell-mediated immune responses of beef and dairy cattle experimentally infested with *Psoroptes ovis*. *American Journal of Veterinary Research*. v. 59, n. 5, p. 583-7, 1998.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. v. 2, p. 235-254, 1965.
- OSSERMAN, E. F.; LAWLOR, D. P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*. v. 124, p. 921-952, 1966.
- OTTO, C. M. et al. Delayed hypersensitivity testing as a clinical measure of cell-mediated immunity in the cat. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 38, p. 91-102, 1993.
- PERNTHANER, A.; SCHILCHER, F.; BAUMGARTNER, W. Acute bovine viral diarrhoea virus infections in Australian cattle. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. v. 52, n. 2-3, p. 104-107, 1997.
- PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *Journal of Dairy Research*. v. 66, n. 4, p. 501-510, 1999.
- POLLOCK, J. M. et al. Effects of weaning on antibody responses in young calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.33, p. 25-36, 1992.
- PONTI, W.; AMADORI, M.; AGNOLETTI, F.; BONIZZI, L.; PERI, E.; CALDORA, C. Characterization of some parameters of non-specific immunity in beef cattle (II). *Journal of Veterinary Medicine, series B*. v. 36, p. 402-408, 1989.

- REDDI, M.V. et al. Evaluation of the cell-mediated immune response in cattle induced by 2,4-dinitrochlorobenzene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 2, p. 483-489, 1981.
- RIEDEL, C. G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostral leukocytes on the immune system of the neonatal calf. III. Effects on phagocytosis. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. v. 98, n. 9, p. 330-334, 1991.
- ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L.; GRIFT, R. W. Effects of BVDV on bovine polymorphonuclear leukocyte function. *American Journal of Veterinary Research*. v. 42, p. 244-250, 1991.
- SATTERFIELD, W.C.; ROURKE, K.L. Management of hypogammaglobulinemic neonatal nondomestic hoofed stock. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 179, p. 1147-1149. 1981.
- SEYFERT, H. M.; HENKE, M.; INTERTHAL, H.; KLUSSMANN, U.; KOCZAN, D.; NATOUR, S.; PUSCH, W.; SENFT, B.; STEINHOFF, U. M.; TUCKORICZ, A.; HOBOM, G. Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: The role of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. v. 113, n. 4-5, p. 269-276, 1996.
- SILVA, M. M.; FARIA JÚNIOR, S. P.; SCHEIBEL, M.; MARTINS, M. F. M.; RABELLO, P.; PASCOAL, P. M.; BERTAGNON, H. G.; BORELLI, P.; MARTINEZ, M. B.; OLIVEIRA, A. A. M.; GARCIA, M. Efeito da verminose na resposta imune humoral em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Baiana de Medicina Veterinária, 2001, p. 118-119.
- TIZARD, I. R. *Imunologia Veterinária*. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 294-299.
- WEICHSELBAUM, C. T. E. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *American Journal of Clinical Pathology*. v. 16, n. 3, p. 40-49, 1946.
- WYCKOFF, J. H. et al. Comparison of Brucella abortus antigen preparations for in vitro stimulation of immune bovine T-lymphocyte cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 36, p. 45-64, 1993.
- ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 3. ed. New jersey: Practice Hall, 1996. 662 p.