

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

USO DE MELOXICAM PARA PREVENIR RESPOSTAS
INFLAMATÓRIAS EM BOVINOS DE CORTE

MURILO CHUBA RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre.

BOTUCATU - SP
Dezembro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

USO DE MELOXICAM PARA PREVENIR RESPOSTAS
INFLAMATÓRIAS EM BOVINOS DE CORTE

MURILO CHUBA RODRIGUES

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Fernandes Cooke

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre.

BOTUCATU - SP
Dezembro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R696u Rodrigues, Murilo Chuba, 1991-
Uso de meloxicam para prevenir respostas inflamatórias em bovinos de corte / Murilo Chuba Rodrigues. - Botucatu: [s.n.], 2016
v, 56 f. : tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016

Orientador: Reinaldo Fernandes Cooke
Inclui bibliografia

1. Bovino de corte - Infecções. 2. Resposta imune. 3. Agentes anti-inflamatórios. I. Cooke, Reinaldo Fernandes II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Laurinda, que desde o início desta jornada, me apoiou em todos os sentidos, mesmo nos momentos mais difíceis. À ela devo todo o mérito dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, pela minha saúde, por iluminar e guiar, e por me colocar no caminho certo para chegar até aqui.

Agradeço ao amigo, professor e orientador Dr. Reinaldo F. Cooke, pela confiança, pela oportunidade, e por todos os aprendizados desde o estágio de graduação até a finalização do mestrado.

Agradeço ao grande amigo e professor Dr. David Bohnert, pela paciência, ensinamentos, confiança e desprendimento em ensinar, e ainda pelo acolhimento e consideração por me receber em sua casa para celebração de Natal.

Agradeço também aos grandes amigos, e também professores, que conquistei em Burns, sem eles não teria conseguido chegar até o fim. Muito obrigado Rodrigo, Daniele, Thomaz, Welington, Bruno, Maria, Tony, Skip, Victor, Luiz Guilherme, Matheus, Lucas, João Vitor, Jacob e Erik.

Sou grato ainda à minha família, pelo incentivo e orgulho demonstrado todos os dias para me manter firme.

Agraço à minha namorada Luana, pelo amor, carinho, respeito, admiração, conselhos, apoio, e paciência, que sei que não foram fáceis durante os dias que ficamos longe um do outro.

Obrigado à todos os servidos da FMVZ-Unesp Botucatu, em especial à Seila e Ellen, pela paciência e orientação para tramitação de todos os documentos e processos exigidos.

Ainda deixo meus agradecimentos ao Prof. Zequinha e Prof. Philipe Moriel, pelas aulas, cobranças e puxões de orelha.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	PÁGINA
Considerações iniciais	07
1. Estresse	09
2. Efeitos do estresse nas reações do sistema imune	10
3. Reações do sistema imune à vacinas	11
4. Reações do sistema imune à infecções bacterianas	14
5. Meios de reduzir os efeitos negativos do estresse em bovinos.....	15
6. Anti-inflamatórios não esteroides (AINE)	16
7. Referências bibliográficas	18
 CAPÍTULO II	
EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL DE MELOXICAM PARA BOVINOS DE CORTE RECEBENDO DESAFIO DE LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO OU VACINA CONTRA PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS	
Resumo	26
Abstract	28
1. Introdução	30
2. Materiais e métodos	31
2.1 Experimento 1	32
2.1.1 Animais e Tratamentos	32
2.1.2 Amostragens	33
2.2 Experimento 2	35
2.2.1 Animais e Tratamentos	35
2.2.2 Amostragens	36
3. Análise estatística	37
4. Resultados e discussão	37
4.1 Experimento 1	37
4.2 Experimento 2	39
5. Referências bibliográficas	41
 TABELAS	48
 CAPÍTULO III	
Implicações	56

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
TABELA 1. Sequências de Primers e número de acesso para todas as transcrições de genes analisados via PCR quantitativo em tempo real no Exp. 1.....	49
TABELA 2. Respostas metabólicas, inflamatórias, e expressão de mRNA no sangue de Novilhos (n=11) e Novilhas (n=10) que receberam infusão de Lipopolissacarídeo Bacteriano (LPS; 0,5 µg/ kg de PC) e selecionados para receber meloxicam via oral (1 mg/kg de PC diariamente) por 7 d (MEL8; n = 7), monidrato de lactose por 7 d (CON; n = 7), ou meloxicam por 1 d e monidrato de lactose por 6 d (MEL1; n = 7).....	50
TABELA 3. Temperatura Retal (RTEMP), concentrações plasmáticas de cortisol, insulina, leptina, haptoglobina, e Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) sérico, e expressão de mRNA no sangue (mudança de fold) para TNF α e ciclooxigenase-2 (COX2) em bovinos de corte (novilhos, n = 11; novilhas, n = 10) em desafio de lipopolissacarídeo bacteriano (0.5 µg/kg PC)	51
TABELA 4. Variáveis metabólicas, inflamatórias, e anticorpos séricos de Novilhos (n=11) e Novilhas (n=10) vacinados contra patógenos causadores de doenças respiratórias e selecionados para receber meloxicam via oral (1 mg/kg de PC diariamente) por 7 d (MEL8; n = 7), monidrato de lactose por 7 d (CON; n = 7), ou meloxicam por 1 d e monidrato de lactose por 6 d (MEL1; n = 7).....	52
TABELA 5. Temperatura Retal (RTEMP), concentrações plasmáticas de cortisol, insulina, leptina, haptoglobina, e Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) sérico, em bovinos de corte (novilhos, n = 11; novilhas, n = 10) vacinados contra patógenos causadores de doenças respiratórias	53
TABELA 6. Concentrações séricas de anticorpos contra Mannheimia haemolytica, e títulos contra vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), Herpesvirus bovino-1 (BHV-1), diarréia viral bovina vírus-1 (BVD-1), e vírus parainfluenza-3 (PI3), em bovinos de corte (novilhos, n = 11; novilhas, n = 10) vacinados contra patógenos causadores de doenças respiratórias.....	54

Capítulo I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O mercado consumidor mundial vem passando por grandes alterações nos últimos anos de forma que os padrões de alimentação estão mudando na direção onde os padrões de consumo estão se deslocando para produtos gerados pela produção pecuária. Essa previsão já foi considerada por Delgado et al. (1999) e, segundo dados da FAO (2015), uma das mudanças mais marcantes notadas ultimamente é o aumento anual de 5 a 6% do consumo de carne em países onde a população também se encontra em constante crescimento. Ligado a isso, alguns países vêm sofrendo grandes alterações ambientais, como por exemplo o Brasil, que nos últimos anos reduziu grandes áreas de floresta para a abertura de novas áreas de pastagens; no entanto, também vem afetando países mais desenvolvidos, pois o grande número de efluentes gerados a partir de confinamentos e outros tipos de operações intensivas de criação de gado pode vir a gerar grandes catástrofes ambientais se não forem bem manejados.

No entanto, essa grande intensificação aplicada ao sistema de produção, provém inúmeras mudanças comportamentais, uma vez que estes animais são, por sua vez, retirados do seu habitat natural e colocado muitas vezes em baias com espaço reduzido e submetidos a dietas altamente energéticas que visam expressar seu máximo potencial produtivo. Além disso, outros manejos como a desmama, o transporte e a vacinação levam os animais a situações de estresse que desencadeiam respostas inflamatórias e de fase aguda (CARROL e FORSBERG, 2007). E, apesar desses fatores serem componentes chave do sistema imune inato, tais reações causam, na maioria das vezes, redução da performance do animal (JOHNSON, 1997).

Tal redução da performance animal ocorre, pois, a ativação e manutenção da resposta imune do organismo é extremamente importante e acarreta em um excessivo gasto energético para o animal. A manutenção de uma resposta febril, por exemplo, extremamente essencial em casos infecciosos, é uma das respostas mais onerosas energeticamente para ser mantida. De modo que o aumento de 1° C aumenta de 10 a 13% o gasto energético com o metabolismo basal do animal (CARROL e FORSBERG, 2007).

No entanto, grande parte dos trabalhos relata que o principal causador de estresse em bovinos é o transporte rodoviário. Só nos Estados Unidos, pelo menos 65% dos bezerros são transportados, normalmente de caminhão, ao longo do país, especialmente

para os estados do Texas, Kansas, Nebraska e Colorado, devido à diferença na especialidade dos estados, onde uns são especializados em produção de bezerros e outros na terminação (SWANSSON e MORROW-TESCH, 2001). O estresse causado pelo transporte, faz com que bovinos recém-chegados ao confinamento tenham um aumento no metabolismo basal e aumento do catabolismo dos tecidos, que acompanhado da redução da ingestão de matéria seca (IMS), reduzem a eficiência em conversão alimentar do animal (JOHNSON, 1997).

No entanto, levantamentos com nutricionistas de confinamento brasileiros (MILLEN et al., 2009; OLIVEIRA e MILLEN, 2014) mostraram que o maior problema de saúde encontrados em animais confinados são os respiratórios e que apesar da perda de desempenho e econômica não ser mensurada nesses trabalhos, dados norte-americanos mensuram que a perda anual por esse mesmo problema chega a 500 milhões de dólares (MILES, 2009).

Ainda, a vacinação contra os patógenos que causam doenças respiratórias em bovinos também inferem em respostas inflamatórias e de fase aguda reduzindo o ganho médio diário, conversão alimentar (ARTHINGTON et al., 2013), e ingestão de matéria seca (RODRIGUES et al., 2015). Sendo assim, pesquisas que visem o desenvolvimento de manejos que beneficiem a proteção imune induzida pela vacinação são totalmente justificadas (ARTHINGTON et al., 2013).

Uma das drogas utilizadas para o combate dessas respostas é o meloxicam. Esse é um anti-inflamatório não esteróide comumente utilizado na medicina veterinária e humana (COETZEE et al., 2009) que por meio da sua administração oral em bovinos, reduz a resposta proteica da fase aguda, melhorando assim a performance dos animais (GUARNIERI FILHO et al., 2014). No entanto, seus efeitos sobre as reações do sistema imune inato ainda devem ser melhor estudados (VAN ENGEN et al., 2014). Baseando-se, portanto, nos efeitos do processo de vacinação (RODRIGUES et al., 2015) e nos benefícios do meloxicam em bovinos estressados (GUARNIERI FILHO et al., 2014), esse estudo hipotetiza que a administração oral de meloxicam em bovinos recebendo infusão de lipopolissacarídeo de parede celular de bactérias (LPS), ou vacinas comerciais contra patógenos de doenças respiratórias, alivia a resposta anti-inflamatória e de fase aguda de bovinos de corte.

1 - ESTRESSE

O termo “estresse” é relacionado a um conjunto de mudanças das funções corporais devido à soma de reações biológicas a distúrbios físicos, mentais ou emocionais que irão afetar diretamente a homeostase do animal (PACAK & PALKOVITS, 2001).

Em sistemas pecuários, é comum a realização de manejos que causem estresse aos animais, como o transporte, castração, descorna, entre outros. Quando o animal é condicionado ao estresse, este tem, como resposta, a liberação do cortisol, que é um componente crítico à essa reação (COETZEE et al., 2013). Portanto, é imprescindível que o estresse seja minimizado e, se possível, regulado.

Arthington et al. (2003) identificaram que manejos que levam ao estresse dos animais, como por exemplo o transporte, causam aumento das citocinas pro-inflamatórias que são responsáveis pelo início da resposta inflamatória do animal. Essas citocinas são proteínas sinalizadoras produzidas primariamente por macrófagos através da resposta à infecção, danificação de tecidos ou ao estresse (JANEWAY et al., 2012).

Visto que a redução do estresse pode levar a menor perda econômica para o produtor (SPEER et al., 2001), algumas alternativas, como o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), explanada nas próximas seções, pode minimizar os efeitos e reduzir tais perdas.

A queda na ingestão de alimentos pode provocar a mobilização das reservas energéticas do animal, e do ponto de vista produtivo, isso é extremamente indesejável. Por exemplo, bovinos desmamados, chegam aos confinamentos norte-americanos, estressados pelo transporte rodoviário e são expostos a dietas com alto nível de concentrado. Esse tipo de alimento gera substrato para bactérias amilolíticas dentro do rúmen, promovendo multiplicação destas bactérias que por sua vez são classificadas como gram-negativas, ou seja, possuem parede celular em sua estrutura e conseqüentemente também possuem LPS, deprimindo consideravelmente sua ingestão de matéria seca (GALYEAN e HUBBERT, 1995). A redução da ingestão de nutrientes amplia os efeitos negativos do estresse no desempenho animal e de seu sistema imune, aumentando a exposição do animal a agentes infecciosos (BERNHARD et al., 2015).

2 – EFEITOS DO ESTRESSE NAS REAÇÕES DO SISTEMA IMUNE.

O sistema imunológico é normalmente dividido em: sistema imune natural, sistema imune inato e sistema imune adquirido e geralmente os dois primeiros são categorizados como imunidade inata que é a parte do sistema que provém da evolução dos mecanismos de luta contra doenças mais antigas que representa a parte do mecanismo de defesa não-específico aos antígenos e possui ação imediata, aproximadamente até quatro horas após a exposição ao mesmo (CARROLL e FOSBERG, 2007).

Portanto, qualquer fator que possa alterar o seu funcionamento correto, pode fazer com que o animal venha a ficar mais susceptível a doenças. Por exemplo, Apanius (1998) e Moberg (2000) afirmaram que fatores relacionados ao estresse, como: temperatura corporal, fluxo sanguíneo, capacidade digestiva, e frequência cardíaca e respiratória; podem vir a reduzir a resposta imune de bovinos de corte.

A resposta ao estresse pode resultar em um complexo conjunto de reações que podem ser chamadas de resposta pró inflamatória (ARTHINGTON et al., 2003). Essa resposta é definida como uma resposta biológica ao rompimento da homeostase do tecido. Como resposta primária e não específica a esse fator, o corpo do animal visa localizar e destruir o fator que está causando tal rompimento e também estimula a reparação do tecido para restaurar sua homeostase (ASHLEY et al., 2012).

Vários fatores podem acarretar em uma resposta inflamatória. Segundo Carroll e Forsberg (2007) processos como castração, desmame, transporte, doenças, socialização, dietas inadequadas ou mudanças de dietas são fatores que podem significativamente estressar bovinos. Assim conclui-se que infecções, estresse físico e psicológico também pode influenciar tal resposta (STEPTOE, et al., 2007).

A resposta de fase aguda é um estímulo pré-inflamatório induzido por uma reação sistêmica, que pode ser resultante de uma condição de estresse. É uma resposta do sistema imune inato, inespecífica e estimulada principalmente pela IL-1 (interleucina-1), TNF- α (fator de necrose tumoral - alfa) e pela IL-6 (interleucina-6), as quais são sinalizadas no hipotálamo, pois possui receptores para as mesmas (BAUMANN e GAULDIE, 1994). Essa reação é desencadeada em situações de estresse, como por exemplo, o desmame ou o transporte de bovinos, e é caracterizado pela síntese e liberação de proteínas

denominadas proteínas de fase aguda. Essas proteínas por sua vez são responsáveis por mediar a resposta inflamatória no tecido adiposo e auxiliam na adaptação metabólica sistêmica. Além disso, reduzem os níveis de albumina e paraoxonase e aumentam em até cinquenta vezes os níveis de proteínas precursoras de amiloide, ceruplasmina e haptoglobina (ARTHINGTON et al., 2003).

3 – REAÇÕES DO SISTEMA IMUNE À VACINAS

Conhecida como a imunidade adquirida, a reação imune às vacinas é denominada de sistema adaptativo. Ela representa parte do sistema imune adaptativo e constrói uma resposta imune específica para cada antígeno encontrado. Sendo assim, o sistema imune adaptativo é caracterizado pela produção de anticorpos que são diretamente direcionados contra antígenos específicos e possui memória imunológica, permitindo que o animal fique protegido às futuras exposições ao mesmo patógeno, produzindo uma resposta mais rápida e mais forte do que da primeira vez que foi exposto a tal patógeno (JANEWAY JUNIOR et al., 2005).

Como citado em outros tópicos, as doenças mais encontradas em bovinos confinados no Brasil e na América do Norte, e que causam grandes prejuízos à produção são doença respiratória bovina. Sendo assim, confinamentos norte-americanos vacinam seus animais no início do confinamento a fim de evitar tais prejuízos. No entanto, a vacinação ocorre no momento da chegada dos animais ao confinamento e estes, por sua vez, já carregam uma grande carga de estresse devido ao transporte e ao manejo de desmame.

Dessa forma, Duff e Galyean (2006) concluíram que a administração da vacina nesse momento de grande estresse pode ter eficácia reduzida, uma vez que o corpo do animal não se encontra em homeostase e, portanto, tem um maior desafio de retornar à sua situação de normalidade e ainda desenvolver imunidade a tais patógenos.

Para avaliação dos efeitos metabólicos e inflamatórios de um processo de vacinação, que é fundamental na cadeia produtiva de bovinos de corte, e ainda seu impacto na IMS, foi realizado um estudo prévio à pesquisa que gerou a presente

dissertação, e assim foram obtidas pré-concepções e definidas algumas diretrizes para enfim delinear uma estratégia de redução dos efeitos negativos do processo.

Sendo assim, Rodrigues *et al.* (2015) avaliaram os efeitos da vacinação contra patógenos respiratórios sobre IMS, respostas metabólicas, inflamatórias e de fase aguda. Os autores vacinaram um grupo de novilhas Angus e compararam com um grupo não vacinado. Em síntese, relataram que a administração de vacina comercial com adjuvantes, pode deprimir a ingestão de forragem por até 2 dias, e que parte dessa redução de consumo se deve às reações metabólicas, inflamatórias e de fase-aguda, que elevaram as concentrações plasmáticas de haptoglobina, cortisol, insulina e leptina, e concentrações séricas de TNF α , e níveis de expressão de RNA para TNF α , com relação ao grupo não vacinado.

Estes dados demonstram que vacinação contra patógenos respiratórios estimula a síntese de TNF α por células de defesa, resultando em uma reação de fase aguda caracterizada pelo aumento da concentração de haptoglobina (RODRIGUES *et al.*, 2015). Segundo os autores, estes resultados corroboram com a queda da IMS registrada nos 2 primeiros dias do estudo, uma vez que haptoglobina e TNF α têm ação sobre o sistema nervoso central e endócrino inibindo funções digestivas (KLASING & KORVER, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2015)

Outro relato dos autores é que uma das primeiras respostas fisiológicas após a vacina contra doenças respiratórias é a elevação do cortisol, que por sua vez tem ação direta sobre as respostas inflamatória e de fase aguda (CARROLL *et al.*, 2009a; RODRIGUES *et al.*, 2015; STEIGER *et al.*, 1999). Insulina por sua vez, após o estímulo patogênico, é sintetizada no organismo (STEIGER *et al.*, 1999; WALDRON *et al.*, 2003) com intuito de aumentar o uso de energia no organismo para restabelecimento da homeostase (WAGGONER *et al.*, 2009).

O aumento nos níveis de cortisol e insulina encontrados por Rodrigues *et al.* (2015) ocorreu sem grande elevação da concentração sérica de TNF α e antecederam o pico de expressão de RNAm para TNF α , indicando que o aumento destes hormônios não depende somente da resposta de citocinas pro-inflamatórias (CARROLL & FORSBERG, 2007; ROSTEIGER *et al.*, 1999). Outro fator importante destes hormônios é que ambos também

colaboram para inibição de ingestão de alimentos (ALLEN et al., 2009; FOSTER et al., 1991; RODRIGUES et al., 2015).

Rodrigues et al. (2015) registraram também um aumento de leptina nos animais que receberam vacina contra patógenos causadores de doenças respiratórias. É sabido que leptina age no sistema nervoso central para limitar ingestão de alimentos e elevar gasto energético (HOUSEKNECHT et al., 1998) com isso Rodrigues et al. (2015) relataram que também pode ter havido influência desse hormônio sobre o consumo deprimido registrado nos primeiros 2 dias após vacinação. Os autores ainda encontraram novas evidências de que a vacinação contra patógenos respiratórios provoca aumento da concentração plasmática de leptina em bovinos.

Leptina possui estrutura molecular semelhante à citocinas pró-inflamatórias e tem ação similar sobre a modulação de resposta inflamatória (FANTUZZI, 2006). É principalmente produzida por adipócitos mas também pode ser sintetizada por leucócitos durante a resposta inflamatória (SCHNEIDERMAN et al., 2012; TAO et al., 2012). Contudo, Rodrigues et al. (2015) relataram que houve aumento da concentração plasmática de leptina porém sem elevar a sua expressão de RNAm nas células sanguíneas, indicando que a vacinação contra patógenos respiratórios estimula a produção de leptina no tecido adiposo.

Este estudo realizado anteriormente por Rodrigues et al. (2015) leva a crer que estas reações compõem mecanismos de defesa e adaptações fisiológicas para combater os antígenos. Contudo tais medidas podem ser prejudiciais para eficiência produtiva dos animais, uma vez que são fatores inversamente relacionados com a IMS.

Para reduzir situações de estresse e minimizar as respostas de fase aguda, Arthington et al. (2003) conduziram um estudo onde vacinaram bovinos recém-chegados ao confinamento e avaliaram seus efeitos durante 21 dias. Esses autores observaram que nas primeiras 2 semanas houve efeito das proteínas de fase aguda no ganho de peso diário (GPD), ingestão de matéria seca (IMS) e eficiência alimentar (EA). Além disso verificaram que as vacinas disponíveis no mercado para os patógenos testados são saudáveis aos animais e que a redução da EA nesse período é inevitável, devido à redução drástica da IMS. Relatam ainda que estudos conjuntos a esse devem ser conduzidos com

relação à melhora na condição nutricional dos animais nessa fase, a fim de reduzir os efeitos da resposta aguda e da liberação das proteínas.

4 - REAÇÕES DO SISTEMA IMUNE À INFECÇÕES BACTERIANAS (LPS)

Infecções bacterianas são associadas a diversas doenças em bovinos. Uma delas, e talvez a que cause maior efeito negativo no desempenho desses animais quando confinados, é o complexo de doenças respiratórias. Tal doença já foi altamente associada à infecção por bactérias gram-negativas (DUFF e GALYEAN, 2006), que liberam uma endotoxina chamada lipopolissacarídeo (LPS) que é, nada menos que um componente da parede celular dessas bactérias (CULLOR, 1992). Essa toxina liberada pelas bactérias entra na corrente sanguínea do animal e causa várias reações, entre elas uma resposta inflamatória que incita, conseqüentemente, a uma resposta do sistema imune, como relatado por alguns autores em estudos relacionados com desafio de LPS. (CARROLL et al., 2009b; STEIGER et al., 1999).

Outros autores verificaram que a presença de LPS na corrente sanguínea faz com que a temperatura corporal aumente, potencializando risco de problemas durante a resposta de fase aguda (CARROLL e BURDICK SANCHEZ, 2014).

Por exemplo a elevação da temperatura vaginal pode fazer com que problemas reprodutivos apareçam, e além disso, os riscos de causar laminite, com efeito da vasoconstrição periférica, causada por hormônios liberadores de corticotropinas e vasopressinas também aumentam (CARROLL et al., 2014).

Carroll & Burdick Sanchez (2014) verificaram que quando animais são induzidos com doses de LPS há aumento dos batimentos cardíacos do animal, podendo ser um grande indicativo de uma possível correlação entre a taxa de batimentos e a resposta pró inflamatória do animal.

Quando chegam no confinamento, os bovinos reduzem a ingestão de matéria seca naturalmente devido à adaptação à nova dieta. Sendo assim, a quantidade de energia ingerida é reduzida (GALYEAN e HUBBERT, 1995) e, conseqüentemente, a quantidade de glicose disponível para manutenção dos processos imunes também. Assim infecções bacterianas podem vir a se manifestar mais facilmente e a concentração de LPS sanguínea

aumentar. Bernhard et al. (2012), portanto propuseram e relataram que o aumento da absorção da glicose por consumo de propionato de crômio pode melhorar a resposta ao desafio de LPS, uma vez que essa reação é totalmente dependente da quantidade de energia que o animal tem disponível para direcionar para tal processo.

Outro fator que compromete a resposta ao LPS é a idade ao desmame. Carroll et al. (2009b) compararam bovinos desmamados precocemente (aproximadamente 3 meses) e na idade normal (aproximadamente 8 meses) e verificaram que quando desmamados normalmente apresentam uma maior amplitude de resposta ao LPS sanguíneo, apresentando maiores concentrações de haptoglobina, ceruloplasmina, TNF- α , IL-1 e IL-6 enquanto as concentrações nos animais desmamados foram menores após o desafio. Concluíram então que quando desmamados precocemente, o sistema imune apresentou-se mais preparado para reconhecer e combater as endotoxinas.

5 – MEIOS DE REDUZIR OS EFEITOS NEGATIVOS DO ESTRESSE EM BOVINOS

Hoje, a produção de bovinos de corte demanda inúmeros manejos que são considerados agentes estressantes. São inúmeros os trabalhos análogos ao de Carroll et al. (2014) que testam o desmame precoce, o qual pode ser considerado um dos primeiros fatores estressantes na vida do animal. Assim como é inevitável que estes animais sejam submetidos ao transporte que já como relataram Swanson e Morrow-Tesch (2001), Arthington et al. (2005) e Guarnieri Filho et al. (2014), esse tipo de manejo é um dos mais estressantes para os animais. Portanto, é imprescindível que alternativas sejam criadas e estudadas a fim de reduzir o estresse e a resposta anti-inflamatória dos animais durante tais manejos.

Marques et al. (2012) relataram que durante o transporte, o grande fator chave para respostas no corpo do animal, é a restrição alimentar e hídrica, uma vez que o nível de cortisol e proteínas de fase-aguda (PFA) aumentam consideravelmente. No entanto, Cooke et al. (2013) não verificaram melhorias no nível de estresse e de resposta anti-inflamatória de animais em transporte, quando esses foram submetidos a paradas para alimentação e hidratação.

Estratégias nutricionais também vêm sendo estudadas, como a alimentação prévia de animais com fonte de ácidos graxos poli-insaturados, como o farelo de camelina, que apresentou resultados favoráveis uma vez que melhorou o desempenho dos animais após o transporte da entrada do confinamento, quando comparados com o grupo que não recebeu tal suplementação (CAPPELLOZZA et al., 2012), indicando que o estresse desse manejo foi reduzido e permitiu a mais rápida recuperação e melhoria do desempenho dos animais.

Além disso, existem relatos na literatura com o uso de medicamentos como anti-inflamatórios não-esteróides (GUARNIERI FILHO et al., 2014) e outros como ácido acetilsalicílico (TREVISI & BERTONI, 2008) e salicilato de sódio (FARNEY et al., 2012) para vacas lactantes. No entanto, ainda não está evidente na literatura formas comprovadas para reduzir o estresse de cada manejo para o animal, que tragam ao produtor um retorno em desempenho suficiente para ser rentável. Portanto, é necessário maior estudo e desenvolvimento de novas alternativas.

6 – ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES (AINE)

É documentado que desafios imunológicos causam alterações na concentração das proteínas de fase aguda na corrente sanguínea, ativando o sistema imune e o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e inibindo o eixo somatotrópico (JOHNSON, 1997). O mesmo autor, afirma que tais desafios ainda resultam em baixos índices de crescimento em animais de produção e aumentam o custo de produção, e que estas mudanças estão fortemente ligadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 e IL-6, que são as grandes responsáveis pelo início das respostas que levam à uma redução do desempenho e eficiência dos animais.

Como resposta ao aumento das citocinas pró-inflamatórias causadas por alguma situação de estresse nos animais, estudos realizados por Baldrige et al. (2011) e Coetzee et al. (2012) mostram que a utilização de AINE pode reduzir o efeito de manejos extremamente estressantes. Anti-inflamatórios não esteroides pertencem à classe desse medicamento que é utilizada para o combate de dores e inflamações. A sua ação ocorre

por meio do bloqueio da produção das prostaglandinas, principais agentes do desencadeamento do processo inflamatório.

Os AINE podem ser classificados pela sua classe e seu mecanismo de ação, quando verificados, encontramos os: salicilatos, derivados do *p*-aminofenol, derivados do pirazol, ácidos arilalcanóides e derivados, derivados do ácido antranílico, compostos de ouro, oxicans, imunossuppressores, inibidores seletivos de COX-2 e diversos, sendo que dentre eles, mais de 7 tipos são utilizados para a administração em bovinos (GUARNIERI FILHO, 2015) com destaque para meloxicam e flunixinina meglumina, como mais utilizados.

Um dos mais utilizados nessa atividade, é um AINE pertencente à classe dos oxicans, o meloxicam (GUARNIERI FILHO, 2015). O meloxicam tem ação seletiva, inibindo a ação da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), impedindo a síntese de prostaglandina (HIRSCH et al., 2003). Smith et al. (2008) relataram a permissão de seu uso na Europa, onde é aplicado para tratamento de doenças respiratórias em bovinos, diarreia e mastite, e também no Canadá, onde é utilizado principalmente como analgésico após o processo de descorna. Ainda, os mesmos autores citam que nos Estados Unidos, a utilização de tal medicamento foi somente liberada para fins comerciais e utilização em baixas dosagens, pois não há o conhecimento do período de carência quando esse medicamento é utilizado em dosagens contínuas.

No Brasil, foi realizado estudo com uso de meloxicam em vacas zebuínas durante protocolo de IATF para amenizar estresse durante remoção temporária de bezerro e melhorar os índices de penhez (COOKE et al., 2016). Os autores avaliaram os efeitos apenas nos d 9 a d 11 do protocolo de sincronização, logo não foram detectados efeitos significativos nos níveis de haptoglobina, mas registrou-se elevação na concentração plasmática de cortisol. Contudo nesse estudo, a administração via intramuscular de meloxicam (0,5 mg/kg PV) não reduziu o nível de cortisol e nem trouxe benefícios aos índices reprodutivos.

Sua administração já foi relatada de diversas maneiras, como: intra-venosa, subcutânea ou intramuscular, no entanto, Coetzee et al. (2009) analisaram o efeito da administração oral em bezerros Holandeses e verificaram que os efeitos do medicamento pela administração oral é o mesmo ou até melhores, quando comparado ao intra-venoso.

Isso ocorreu, pois, a biodisponibilidade foi maior no tratamento oral, no qual a meia-vida média de eliminação de meloxicam foi de 27,54 horas, quando administrado via oral para bovinos na concentração de 1mg/kg de peso corporal. Os mesmos autores afirmam ainda que o meloxicam pode ter efeitos em reduzir a resposta antiinflamatória mais eficientes contra estímulos de estresse, quando comparado por exemplo, a outro antiinflamatório de amplo uso, o flunixin meglumine (4 a 8 h de meia vida).

A utilização desse fármaco já é bem descrita na medicina humana e animal, e na literatura encontramos várias citações como: Guarnieri Filho et al. (2014), Liu et al. (2003), Repenning et al. (2014), Brown et al. (2015), que testaram seus efeitos em situações de estresse e no geral a substância foi capaz de reduzir a resposta inflamatória e melhorar o desempenho do animal.

Com base em todas estas considerações foi delineado um experimento que avaliasse os efeitos do Meloxicam sobre as respostas metabólicas, inflamatórias e de fase-aguda em bovinos sob situações estressantes incitadas por desafios imunológicos, sendo eles a administração de LPS bacteriano isolado ou vacina contra patógenos respiratórios. O estudo está descrito no próximo capítulo sob normas da revista *Journal of Animal Science*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. S. et al. BOARD-INVITED REVIEW: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 87, n. 10, p.3317-3334, 31 jul. 2009. American Society of Animal Science (ASAS).

APANJUS, V. Stress and immune defense. In: A. P. Moller, M. Milinski, and P. J. B. Slater, editors, **Stress and behavior**. Academic Press, San Diego, CA. p. 133–150, 1998.

ARAUJO, D. B. et al. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on performance and physiological responses of growing cattle after transportation and feedlot entry. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 88, n. 12, p.4120-4132, 20 ago. 2010.

ARTHINGTON, J. D. et al. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. **Journal of Animal Science**. v.81, p.1120–1125, 2003.

ARTHINGTON, J. D. et al. Effects of vaccination on the acute-phase protein response and measures of performance in growing beef calves. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 91, n. 4, p.1831-1837, 2013.

ARTHINGTON, J. D.; SPEARS, J. W.; MILLER, D. C. The effect of early weaning on feedlot performance and measures of stress in beef calves. **Journal of Animal Science**. v. 83, p. 933- 939, 2005.

ASHLEY, N. T., Z. M. WEIL, R. J. NELSON. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v43, p 385-406, 2012.

BALDRIDGE, S. L. et al. Pharmacokinetics and physiologic effects of intramuscularly administered xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride-butorphanol tartrate alone or in combination with orally administered sodium salicylate on biomarkers of pain in Holstein calves following castration and dehorning. **American Journal of Veterinary Research**. v.72, p.1305–1317, 2011.

BAUMANN, H.; J. GAULDIE. The acute phase response. **Immunology Today** v.15, p.74–80, 1994.

BERNHARD, B. C. et al. Chromium supplementation alters the performance and health of feedlot cattle during the receiving period and enhances their metabolic response to a lipopolysaccharide challenge. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 90, n. 11, p.3879-3888, 4 jun. 2012.

BROWN, A. C. et al. Effect of castration timing and oral meloxicam administration on growth performance, inflammation, behavior, and carcass quality of beef calves. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 93, n. 5, p.2460-2470, 2015.

CAPPELLOZZA, B. I. et al. Effects of camelina meal supplementation on ruminal forage degradability, performance, and physiological responses of beef cattle. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 90, n. 11, p.4042-4054, 14 maio 2012.

CARROLL, J. A.; ARTHINGTON, J. D.; CHASE JR, C. C. Early weaning alters the acute phase reaction to an endotoxin challenge in beef calves. **Journal of Animal Science**. v. 87, p. 4167-4172, 2009b.

CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**. v. 23, p. 105-149, 2007.

CARROLL, J. A.; SANCHEZ, N. C. B.; BILL E. KUNKLE INTERDISCIPLINARY BEEF SYMPOSIUM: Overlapping physiological responses and endocrine biomarkers that are indicative of stress responsiveness and immune function in beef cattle. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 92, n. 12, p.5311-5318, 1 ago. 2014.

CARROLL, J. A. et al. A dual challenge of corticotropin releasing hormone and vasopressin alters immune cell profiles in beef heifers. **Journal of Animal Science**. v.92(E-Suppl. 2), p. 33. 2014 (Res.)

CARROLL, J. A. et al. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.81-89, 1 abr. 2009a

COETZEE, J. F. et al. Pharmacokinetics of intravenous and oral meloxicam in ruminant calves. **The Veterinary Theriogenology**. v. 10, p.E1–E8, 2009

COETZEE, J. F. et al. Pharmacokinetics and effect of intravenous meloxicam in weaned Holstein calves following scoop dehorning without local anesthesia. **Bmc Vet Res**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.153-160, 2012.

COETZEE, J. F. Assessment and Management of Pain Associated with Castration in Cattle. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.75-101, mar. 2013.

COOKE, R. F. et al. Rest stops during road transport: Impacts on performance and acute-phase protein responses of feeder cattle. **Journal of Animal Science**. v. 91, p. 5448-5454, 2013.

COOKE, R. F. et al. Impacts of meloxicam administration before temporary calf weaning on physiological and reproductive responses of beef cows. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.406-411, 2016.

DELGADO, C. et al. Livestock to 2020 – The Next Food Revolution. **Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper 28**. IFPRI, Washington D.C. 1999.

DUFF, G. C.; GALYEAN, M. L. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 85, n. 3, p.823-840, 23 out. 2006.

FANTUZZI, Giamila. Leptin: Nourishment for the immune system. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 36, n. 12, p.3101-3104, dez. 2006.

FARNEY, J. K. et al. Effects of Sodium Salicylate on Productivity of Postpartum Dairy Cows. **Dairy Day, 2011**, Kansas State University, Manhattan, KS, Estados Unidos, 2011 Disponível em: <http://krex.kstate.edu/dspace/bitstream/handle/2097/14649/Dairy2011pg2630.pdf?sequence=1>. Acessado em 17 de Fevereiro, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), Corporate Document Repository. **World Agriculture: Towards 2015/2030**. An FAO perspective: Livestock commodities, p.158-159, 2015.

FOSTER, L.A.; AMES, N.K.; EMERY, R.S. Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.745-749, out. 1991

GALYEAN, M. L.; HUBBERT, M. E. Effects of season, health, and management on feed intake by beef cattle. Pages 226–234 in **Symposium: Intake by Feedlot Cattle**. F. N. Owens, ed. Oklahoma Agric. Exp. Stn., p.942-943. 1995.

GUARNIERI FILHO, T. A. **Utilização do meloxicam para reduzir respostas inflamatórias em bovinos de corte transportados**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2015.

GUARNIERI FILHO, T. A. et al. Effects of meloxicam administration on physiological and performance responses of transported feeder cattle. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 92, n. 9, p.4137-4144, 14 jul. 2014.

HOUSEKNECHT, K L et al. The biology of leptin: a review. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 76, n. 5, p.1405-1420, 1998.

JANEWAY, C. A. Jr.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Immunobiology, the immune system in healthy and disease. **New York: Galrland Science Publishing**, New York, NY, Estados Unidos, 2005.

JANEWAY, C. A. Jr. et al. Janeway's immunobiology. **New York: Garland Science Publishing**, New York, NY, Estados Unidos, 2012.

JOHNSON, R. W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view. **Journal of Animal Science**. v. 75, p. 1244–1255, 1997.

KLASING, K. C.; KORVER, D. R. Leukocytic Cytokines Regulate Growth Rate and Composition Following Activation of the Immune System1. **Journal of Animal Science**. v. 75. P. 58-67, 1997. doi:10.2527/animalsci1997.75Supplement_258x

LIU, Y. L. et al. Effects of fish oil supplementation on the performance and the immunological, adrenal, and somatotropic responses of weaned pigs after an Escherichia coli lipopolysaccharide challenge. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 2758–2765, 2003

MARQUES, R. S. et al. Effects of 24-h transport or 24-h feed and water deprivation on physiologic and performance responses of feeder cattle. **Journal of Animal Science**. v. 90, p. 5040–5046, 2012.

MILES, D. G. Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). **Animal Health Research Reviews**. v. 10, p. 101–103, 2009.

MILLEN, D. D. et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 87, n. 10, p.3427-3439, 2 jul. 2009.

MOBERG, G. P. Biological responses to stress: Implications for animal welfare. In: *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*, CAB International, Oxon, UK. p. 1-21, 2000.

OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 64-75, 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.010>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

PACAK, K.; PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 502–550. 2001.

QIU, X. et al. Genetic effects on acute phase protein response to the stresses of weaning and transportation in beef calves. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 85, n. 10, p.2367-2374, 2007.

REPENNING, P. E. et al. Impact of oral meloxicam administration before and after band castration on feedlot performance and behavioral response in weanling beef bulls. **Journal of Animal Science**. v. 91, p. 4965–4974, 2013.

RODRIGUES, M. C., et al. Effects of vaccination against respiratory pathogens on feed intake, metabolic, and inflammatory responses in beef heifers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 93, n. 9, p.4443-4452, 2015.

SCHNEIDERMAN, J. et al. Leptin Locally Synthesized in Carotid Atherosclerotic Plaques Could Be Associated With Lesion Instability and Cerebral Emboli. **Journal Of The American Heart Association**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.e001727, 4 set. 2012.

SMITH, G. W. et al. Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v. 23, p. 697–701, 2008.

STEIGER, M et al. Effect of a prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 77, n. 9, p. 2523-2532, mar. 1999.

STEPTOE, A.; HAMER M.; CHIDA, Y. The effects of acute physiological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunology**. v. 21, p.901-912, 2007.

SWANSON, J. C.; MORROW-TESCH, J. Cattle transport: Historical, research, and future perspectives. **Journal Of Animal Science**. v. 79 (E. Suppl.): p. E102–E109, 2001.

TAO, M. et al. Locally Applied Leptin Induces Regional Aortic Wall Degeneration Preceding Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.311-320, 6 dez. 2012.

TREVISI, E.; BERTONI, G. Attenuation with acetylsalicylate treatments of inflammatory conditions in periparturient dairy cows. Páginas 22-37 in Aspirin and Health Research Progress. P. I. Quinn, ed. **Nova Science Publishers**, 2008.

WAGGONER, J. W. et al. Effects of dietary protein and bacterial lipopolysaccharide infusion on nitrogen metabolism and hormonal responses of growing beef steers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 87, n. 11, p.3656-3668, 31 jul. 2009.

WALDRON, M. R. et al. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and Hepatic Metabolism in Lactating Cows. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 86, n. 11, p.3447-3459, nov. 2003.

Capítulo II

Efeitos da administração via oral de meloxicam para bovinos de corte recebendo desafio de lipopolissacarídeo bacteriano ou vacina contra patógenos respiratórios.

Resumo: Este estudo avaliou os efeitos da administração oral de meloxicam nas respostas metabólicas, inflamatórias e de fase-aguda em bovinos de corte recebendo um desafio de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (Exp. 1; d -1 a d 6) ou vacina contra patógenos respiratórios (Exp. 2; d 7 a d 21). Vinte e um novilhos (n=11) e novilhas (n=10) foram alocados em baias individuais no d -15 e receberam água, mistura de sais minerais e vitaminas, e feno de alfafa *ad libitum* até d 21. No d -1, os animais foram classificados por sexo e peso corporal (PC) e designado para um dos três tratamentos a seguir: 1) Administração via oral de Meloxicam (1mg/Kg PC, diariamente; Carlsbad Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA) do d -1 até d 6 (MEL8); 2) Administração via oral de Meloxicam (1mg/Kg PC; Carlsbad Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA) no d 0 e de monidrato de lactose (1mg/Kg PC; Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA) no d -1 e do d 1 até d 6 (MEL1); ou 3) Administração via oral de monidrato de lactose (1mg/Kg PC, diariamente; Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA) do d -1 até d 6 (CON). Para o Experimento 1, no d 0, os animais receberam infusão intravenosa de LPS (0,5 µg/Kg PC; *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) simultaneamente à administração do tratamento. Temperatura retal (RTEMP) foi medida, e amostras de sangue coletadas nas horas -2, 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, e 144 h relativa à administração de LPS. Não foram detectados efeitos de tratamentos ($P \geq 0,36$) para RTEMP, concentração sérica de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α), concentrações plasmáticas de haptoglobina, cortisol, insulina e leptina, assim como para expressão de RNAm sanguíneo para TNF α e ciclooxigenase-2 (COX2), contudo todas as variáveis se elevaram ($P < 0,01$) dentre os tratamentos, após administração de LPS.

No Experimento 2, os animais receberam os mesmos tratamentos para os quais foram designados no Exp. 1, dos dias d 7 até d 13 e foram vacinados contra patógenos respiratórios juntamente com a administração dos tratamentos no d 8. Amostras de sangue foram coletadas e RTEMP registradas nos mesmos momentos realizados no Exp. 1 com adição das horas 168, 240 e 336 h relativas ao momento da vacinação. Nenhum efeito de

tratamento foi detectado ($P \geq 0,26$) para RTEMP, nem para nenhuma das mesmas concentrações plasmáticas e séricas avaliadas no Exp. 1, e concentrações séricas de anticorpos contra *Mannheimia haemolytica* ou títulos contra Vírus Sincicial Bovino, Herpesvirus-1, Diarreia Viral Bovina vírus-1, e Vírus Parainfluenza-3. Todas as variáveis aumentaram ($P < 0,01$) dentre os tratamentos após a vacinação, exceto para TNF α sérico e títulos contra Diarreia Viral Bovina vírus-1 ($P \geq 0,40$). Coletivamente, este estudo não encontrou evidências de que administração oral de meloxicam, nas doses e intervalos adotados, mitigaram reações metabólicas, inflamatórias e de fase-aguda desencadeadas pela infusão de LPS ou vacinação contra doenças respiratórias.

Palavras-chave: gado de corte, inflamação, lipopolissacarídeo, meloxicam, vacinação.

Effects of oral meloxicam administration to beef cattle receiving lipopolysaccharide administration or vaccination against respiratory pathogens

Abstract: This study evaluated the effects of oral meloxicam administration on metabolic, inflammatory, and acute-phase responses of beef cattle receiving a lipopolysaccharide (LPS) challenge (Exp. 1; d -1 to 6) or vaccinated against respiratory pathogens (Exp. 2; d 7 to 21). Twenty-one Angus steers (n = 11) and heifers (n = 10) were housed in individual pens on d -15 and were offered free-choice water, mineral-vitamin mix, and hay until d 21. In Exp. 1, cattle were ranked on d -1 by sex and BW and assigned to 1) oral meloxicam administration (1 mg/kg BW daily) from day -1 to 6 (MEL8), 2) oral meloxicam administration (1 mg/kg BW) on d 0 and oral lactose monohydrate administration (1 mg/kg BW) on d -1 and from d 1 to 6 (MEL1), or 3) oral lactose monohydrate administration (1 mg/kg BW daily) from d -1 to 6 (CON). On d 0, cattle received an intravenous LPS bolus (0.5 µg/kg BW) concurrently with treatment administration. Rectal temperature (RTEMP) was assessed, and blood samples were collected at -2, 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, and 144 h relative to LPS administration. No treatment effects were detected ($P \geq 0.36$) for RTEMP, concentrations of serum tumor necrosis factor α (TNF α), plasma haptoglobin, cortisol, insulin, and leptin, as well as blood mRNA expression of TNF α and cyclooxygenase-2, although all variables increased ($P < 0.01$) across treatments after LPS administration.

In Exp. 2, cattle received the same treatments that they were assigned to in Exp. 1 from d 7 to d 13 and were vaccinated against respiratory pathogens concurrently with treatment administration on d 8. Blood samples were collected, and RTEMP was assessed as in Exp. 1 in addition to 168, 240, and 336 h relative to vaccination. No treatment effects were detected ($P \geq 0.26$) for RTEMP, the same plasma and serum variables evaluated in Exp. 1, and serum concentrations of antibodies against *Mannheimia haemolytica* or serum titers against bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea virus-1, and parainfluenza-3 virus. All variables increased ($P < 0.01$) across treatments after vaccination, except for serum TNF α and titers against bovine viral diarrhea virus-1 ($P \geq 0.40$). Collectively, this study found no evidence that oral meloxicam administration, at the doses and intervals utilized herein, mitigated the

metabolic, inflammatory, and acute-phase reactions elicited by LPS administration or vaccination against respiratory pathogens.

Key words: beef cattle, inflammation, lipopolysaccharide, meloxicam, vaccination

1.Introdução

Manejos estressantes como por exemplo o desmame, transporte e vacinação, estimulam respostas inflamatórias e de fase-aguda em bovinos (Carroll and Forsberg, 2007). Essas reações são importantes processos do sistema imune inato mas podem ser prejudiciais para o desempenho dos animais (Johnson, 1997). Meloxicam é um anti-inflamatório não-esteróide comumente utilizado na medicina animal e humana (Coetzee *et al.*, 2009). Guarnieri Filho *et al.* (2014) relataram que a administração via oral de meloxicam para bovinos aliviou a resposta de proteína de fase-aguda e preveniu a queda no ganho médio diário (GMD), ingestão de matéria seca (IMS), e eficiência alimentar (G:I) causada pelo transporte e entrada no confinamento. Contudo, ainda são necessários mais estudos para compreender melhor o papel do meloxicam nas reações imunes inatas (Van Engen *et al.*, 2014) e que biologicamente sustente os benefícios para bovinos de corte sob grande estresse. Um modelo experimental que caracteriza os efeitos do meloxicam no sistema imune inato de bovinos é o desafio de lipopolissacarídeos bacteriano (LPS) e subsequente avaliação dos parâmetros metabólicos, inflamatórios e de fase-aguda (Carroll *et al.*, 2009). Vacinação contra agentes patogênicos causadores de doenças respiratórias em bovinos, também estimulam reações inflamatórias e de proteínas de fase-aguda além de redução no GMD, E:A (Arthington *et al.*, 2013), e IMS (Rodrigues *et al.*, 2015) em animais confinados.

Portanto, é necessário pesquisar e desenvolver manejos que beneficiem tanto a proteção imunológica como também o desempenho dos bovinos (Arthington *et al.*, 2013). Com base nos benefícios do meloxicam para bovinos sob estresse (Guarnieri Filho *et al.*, 2014), surgiu a hipótese de que administração oral de meloxicam para bovinos recebendo o desafio de LPS ou vacinação contra patógenos respiratórios, alivia as respostas inflamatória e de fase-aguda resultantes. Conseqüentemente, este estudo avaliou os efeitos da administração via oral de meloxicam nos parâmetros metabólicos, inflamatórios e de fase-aguda em novilhos e novilhas de corte recebendo desafio de LPS bacteriano (Exp. 1) ou vacina contra patógenos respiratórios (Exp. 2).

2. Materiais e métodos

Ambos experimentos foram conduzidos no Centro de Pesquisa da Universidade Estadual do Oregon (OSU) nos Estados Unidos (*Eastern Oregon Agricultural Research Center, Oregon State University, Burns, OR, EUA*). Os animais utilizados foram manejados de acordo com os protocolos de boas práticas experimentais e de bem-estar animal aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados de Animais da OSU (*Institutional Animal Care and Use Committee – N° 4592*) e também pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu (N° 14/2015 – CEUA/FMVZ).

Vinte e um bovinos da raça Angus, 11 novilhos e 10 novilhas, foram utilizados no Exp. 1 (d -1 até d 6) e posteriormente no Exp. 2 (d7 até d 21). Todos animais são provenientes do mesmo rebanho, sob o mesmo manejo desde a gestação, nascimento, até o início do experimento, quando foram desmamados no d -21 e treinados com cabresto diariamente até o d -2 para que reduzisse os impactos do manuseio por pessoas e desmame nas variáveis que foram analisadas neste estudo (Arthington *et al.*, 2005; Cooke & Bohnert, 2011; Cooke *et al.*, 2012). No desmame, os animais foram vacinados contra *Clostridium* (2mL injeção subcutânea One Shot Ultra 7, Zoetis, Florham Park, NJ, EUA), vírus causador de rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus parainfluenza-3, vírus sincicial respiratório bovino, vírus tipo 1 e 2 de diarreia viral bovina, e *M. haemolytica* (2mL injeção subcutânea Bovi-shield Gold One Shot, Zoetis, Florham Park, NJ, EUA). Também foi administrado anti-helmíntico (1mL/50kg PC via subcutânea de Dectomax; Zoetis, Florham Park, NJ, EUA).

Do d -15 até d 21, os animais foram alocados em baias individuais (7 x 15m) e receberam água, suplemento comercial vitamínico e mineral, e feno misto de alfafa para consumo *ad libitum*. Amostras de feno foram coletadas semanalmente, e analisadas para determinação dos níveis nutricionais por um laboratório comercial de análises bromatológicas (Dairy One Forage Laboratory, Ithaca, NY, EUA). As amostras foram analisadas por determinação química das concentrações de PB (método 984.13; AOAC, 2006), FDA (método 973.18 adaptado para analisador de fibras Ankom 200, Ankom Technology Corp., Fairport, NY, EUA; AOAC, 2006), e FDN (Van Soest *et al.*, 1991; adaptado para analisador de fibras Ankom 200, Ankom Technology Corp., Fairport, NY,

EUA). Para os cálculos de NDT utilizou-se da equação proposta por Weiss *et al.* (1992), enquanto as equações adotadas para determinação de ELM e ELG foram as propostas por NRC (2000). O perfil nutricional do feno foi (com base de matéria seca) 64,0% NDT, 34,0% FDN, 24,0% FDA, 1,41 Mcal/kg de ELM, 0,83% Mcal/kg de ELG, e 20,0% de PB. O suplemento mineral (Cattleman's Choice, Perfomix Nutrition Systems, Nampa, ID, EUA), continha 14% Ca, 10% P, 16% NaCl, 1,5% Mg, 3.200mg/kg de Cu, 65mg/kg de I, 900mg/kg de Se, 6.000mg/kg de Zn, 136.000 UI/kg de Vitamina A, 13.000 UI/kg de Vitamina D3 e 50 UI/kg de Vitamina E.

2.1 - Experimento 1

2.1.1 - Animais e tratamentos

No d -1, os animais foram classificados por sexo e PC (PC inicial = 232 ± 4 kg, Idade inicial = 223 ± 2 d) e alocados em 1 dos 3 tratamentos:

- 1) Administração via oral de Meloxicam (1mg/Kg PC, diariamente; Carlsbad Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA) do d -1 até d 6 (MEL8);
- 2) Administração via oral de Meloxicam (1mg/Kg PC; Carlsbad Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA) no d 0 e de monidrato de lactose (1mg/Kg PC; Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA) no d -1 e do d 1 até d 6 (MEL1);
- 3) Administração via oral de monidrato de lactose (1mg/Kg PC, diariamente; Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA) do d -1 até d 6 (CON)

Meloxicam era apresentado originalmente em tabletes de 15mg, que foram moídos diariamente utilizando um processador de alimentos comercial (Soho Food Processor; West Bend Housewares, West Bend, WI, EUA) para assegurar que os animais MEL8 e MEL1 receberiam a dose exata de acordo com seus respectivos PC iniciais (média do PC cheio obtida nos d -2 e -1). Monidrato de lactose foi administrado para contar como potencial efeito placebo. Meloxicam e monidrato de lactose foram

misturados manualmente com 50mL de Solução Salina 0,9% até se dissolverem completamente e administrados individualmente para os animais via oral às 08h00 assegurando a ingestão completa do produto. Tratamentos foram dissolvidos em solução salina dentro de 30 segundos antes da administração por meio de seringas estéreis de 60mL (Monoject Covidien Animal Health; Mansfield, MA, EUA). No d 0, todos animais receberam um bólus de LPS bacteriano (0.5 µg/kg PC, Escherichia coli 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) juntamente com a administração do tratamento (Carroll *et al.*, 2009). O LPS bacteriano foi dissolvido em 10 mL de Solução Salina 0,9% imediatamente antes da aplicação do desafio, com uso de seringas estéreis de 10mL (Monoject Covidien Animal Health; Mansfield, MA, EUA) de acordo com o PC inicial (média do PC cheio obtida nos d -2 e -1). O intervalo experimental (d -1 a 6) foi apropriado para avaliar as respostas do sistema imune inato causadas pelo desafio de LPS sem deixar nenhum potencial efeito para o Exp. 2, considerando-se que as variáveis avaliadas regressam aos níveis basais dentro de 5 dias após administração de LPS (Carroll *et al.*, 2009). Os tratamentos MEL8 e CON são baseados no estudo feito por Guarnieri Filho *et al.* (2014) e pesquisas anteriores que indicam que a concentração de proteínas de fase-aguda na circulação pode ficar elevada por até 5 dias após um estímulo patogênico ou por estresse (Cooke *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2015). Guarnieri Filho *et al.* (2014) também sugerem que diferentes intervalos de administração de meloxicam devem ser investigados, portanto, o tratamento MEL1 foi incluído neste estudo para determinar se uma dose única de meloxicam é capaz de mitigar as respostas inflamatórias e de fase aguda causadas pelo desafio de LPS, que se iniciam dentro das 24 horas seguintes à aplicação, enquanto que a meia-vida média de eliminação de meloxicam é de 28 horas, quando administrado via oral para bovinos na concentração de 1mg/kg (Coetzee *et al.*, 2009).

2.1.2 - Amostragens

A temperatura retal dos animais foi aferida com um termômetro digital GLA M750 (GLA Agricultural Electronics, San Luis Obispo, CA, EUA) a cada 2 horas desde -2 até 8h, a cada 6 horas da 12 até 24h, a cada 12 horas da 36 até 72h, e a cada 24 horas da 96 até 144h relativas à aplicação de LPS na hora 0. Amostras de sangue foram

coletadas nos mesmos momentos de aferição da temperatura retal, via punção da veia jugular em tubos comerciais de coleta de sangue (Vacutainer, 10-mL; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) com e sem heparina sódica para coleta de plasma e soro respectivamente. As amostras de sangue foram imediatamente colocadas em gelo, em seguida centrifugadas (2.500 x G por 30 minutos; 4°C) para colheita do plasma ou soro, e armazenadas à -80°C no mesmo dia da coleta. Todas amostras de plasma foram submetidas à análise da concentração de haptoglobina de acordo com método colorimétrico descrito por Cooke & Arthington (2013). Amostras de plasma coletadas de 0h a 48h foram submetidas também às análises de concentrações de cortisol, insulina e leptina. Concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) foi analisado em amostras de soro coletados nos momentos 0h até 6h com base nos resultados mostrados por Carroll *et al.* (2009). Concentração de cortisol e insulina foram determinados através de imunoensaio enzimático quimioluminescente (Immulite 1000; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, EUA). Concentração plasmática de leptina foi analisada por radioimunoensaio de acordo com procedimentos descritos por Delavaud *et al.* (2000). Concentrações séricas de TNF α foram determinadas com uso de um kit ELISA comercial, específico para bovinos (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, EUA). O CV intra e inter ensaios das análises de haptoglobina foram respectivamente 2,7% e 3,7% e da análise de TNF α foram respectivamente 4,8% e 7,2%. Cortisol, insulina e leptina foram analisados em um único ensaio com CV de 3,3% para cortisol, 2,1% para insulina e 4,2% para leptina.

Foram coletadas amostras de sangue adicionais, em tubos PAXgene (Qiagen, Valencia, CA, EUA) nos momentos 0, 2 e 4h relativos à aplicação de LPS para subsequente isolamento de RNA para análise de expressão de mRNA de TNF α , ciclooxigenase-2 (COX2), e β 2-microglobulina em células sanguíneas via técnica de PCR por transcrição reversa quantitativa em tempo real. Após a coleta, os tubos PAXgene foram mantidos em temperatura ambiente durante a noite e então congelados à -80°C até o isolamento de RNA. RNA total foi extraído das amostras de sangue com uso de um kit PAXgene Blood RNA (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Quantidade e qualidade do RNA isolado foi medido por absorvância UV (UV Mini 1240; Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, MD, EUA) à medida de 260nm e 260/280nm respectivamente (Fleige and Pfaffl, 2006). O RNA extraído (120ng) foi transcrito reversamente usando o Kit de

Transcrição Reversa cDNA de alta capacidade com hexâmeros aleatórios (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). PCR em tempo real foi completado utilizando o protocolo *Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e *primers* específicos de gene (20 pM cada; Tabela 1) com o StepOne Realtime PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com procedimentos descritos por Cooke *et al.* (2008). Ao final de cada PCR-TR, os produtos amplificados foram submetidos a um gradiente de dissociação (95°C por 15 s, 60°C por 30 s, e 95°C por 15 s) para verificar a amplificação de um único produto por desnaturação à temperatura antecipada. Os resultados foram quantificados com base no ciclo de limiares (CL), o número de ciclos PCR necessários para amplificação atingir um limiar predeterminado. Os resultados de CL para TNF α e COX2 foram normalizados para β 2-microglobulina (Silva *et al.*, 2008), e o CV para valores de CL de β 2-microglobulina dentre todas as amostras foi de 4,2%. Os resultados são expressados como mudança de *fold* ($2^{-\Delta\Delta CT}$), como descrito por Ocón-Grove *et al.* (2008).

2.2 - Experimento 2

2.2.1 - Animais e tratamentos

Imediatamente após a última coleta do Experimento 1 no d 6, os animais (PC = 228 ± 4 kg, idade = 230 ± 2 d) foram designados ao Experimento 2. Todos animais receberam os mesmos tratamentos aos quais foram submetidos durante o Experimento 1, e foram aplicados também às 8h00 do d 7 até d 13. No d 7, os animais foram revacinados contra rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus parainfluenza-3, vírus sincicial respiratório bovino, diarreia viral bovina tipos 1 e 2, e *M. haemolytica* (2 mL subcutâneo de Bovi-Shield Gold One Shot; Zoetis, Florham Park, NJ, EUA), juntamente com a administração do tratamento. O intervalo entre a primeira aplicação (d -21) e a revacinação (d 7) seguiram as recomendações do fabricante (Zoetis) da vacina para os agentes infecciosos respiratórios. Apesar de revacinação contra *M. haemolytica* não ser obrigatória, esta é uma prática comum em confinamentos comerciais devido à frequente falta de histórico de sanidade dos rebanhos dos quais os terneiros são provenientes (Richeson *et al.*, 2008;

Edwards, 2010). Como no Experimento 1, os tratamentos MEL8 e CON são baseados nos estudos anteriores da presente equipe de pesquisa (Cooke *et al.*, 2012; Guarnieri Filho *et al.*, 2014).

Dado que leucócitos responsáveis pela resposta inflamatório e de fase-aguda são diretamente envolvidos com a sinalização de antígeno para células T (Durum & Muegge, 1996), a administração excessiva de meloxicam poderia afetar a resposta imune inata necessária para a adequada eficiência da vacina. Portanto, MEL1 foi adotado para determinar se uma única administração de meloxicam, simultaneamente ao manejo de vacinação, seria capaz de modular as respostas inflamatórias e de fase-aguda (Arthington *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2015) sem afetar a eficácia da vacina.

2.2.2 - Amostragem

Temperatura retal foi registrada e amostras de sangue foram coletadas para as mesmas variáveis analisadas em plasma e soro como feito no Experimento 1. Amostras de sangue adicionais foram coletadas nos momentos 168h, 240h, e 336h relativos à aplicação da vacina na hora 0 no d 7, e avaliadas as respectivas concentrações de haptoglobina no plasma (Cooke and Arthington, 2013). Além disso, amostras de soro coletadas imediatamente antes (0h) e 168h, 240h e 336h após a vacinação também foram analisadas para determinar as concentrações de anticorpos contra *M. haemolytica* (Confer *et al.*, 1996; Burciaga-Robles *et al.*, 2010), e também títulos contra Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), Hepesvirus bovino-1 (BHV-1), Diarréia Viral Bovina Tipo-1 (BVD-1), e Vírus Parainfluenza-3 (PI-3) através de teste de neutralização viral (Rosenbaum *et al.*, 1970; Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory, Stillwater, OK, EUA). O CV intra e inter ensaios foram respectivamente 4,2 e 4,3% para haptoglobina, e 2,1% e 4,7% para TNF α . Concentrações plasmáticas de cortisol, insulina e leptina foram analisadas em um único ensaio cujo CV foi de respectivamente 5,1% para cortisol, 1,7% para insulina e 2,6% para leptina.

3 - Análise estatística

Os dados de ambos experimentos foram analisados por meio do procedimento MIXED do programa SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA) e com aproximação Satterthwaite para determinar os graus de liberdade para os testes de efeitos fixos. A unidade experimental considerada foi o animal. Todos os modelos continham os efeitos de tratamento, tempo, sexo, e todas as interações. Animal (tratamento x sexo) foi usado como variável aleatória. O termo específico utilizado para repetição foi tempo, e a estrutura de covariância adotada foi autoregressiva, que forneceu o menor critério de informação Akaike e portanto o melhor ajuste. Os resultados foram expressados em quadrados mínimos e separados usando procedimento PDIFF. Significância foi estabelecida com $P \leq 0.05$, e tendências entre $P > 0.05$ e ≤ 0.10 .

4 - Resultados e discussão

4.1 - Experimento 1

Nenhum efeito foi detectado ($P \geq 0.36$) em temperatura retal, concentração sérica de TNF α , concentração plasmática de haptoglobina, e expressão de mRNA para TNF α e COX2 (Tabela 2). Efeitos de tempo foram detectados ($P < 0.01$) para todas estas variáveis (Tabela 3) indicando que o desafio de LPS causou a resposta imune esperada (Carroll and Forsberg, 2007) como também relatado por outros (Carroll *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2008; Waggoner *et al.*, 2009). Após um estímulo patogênico como administração de LPS, o sistema imune inato provoca reações severas com a intenção de controlar ou eliminar a infecção (Abbas and Lichtman, 2007). Isto inclui a síntese de citocinas pro-inflamatórias como TNF α pelos leucócitos e subsequente aumento da temperatura corporal, via modulação da enzima COX2 e síntese hepática de proteínas de fase-aguda como haptoglobina (Carroll and Forsberg, 2007; Silva *et al.*, 2008). De acordo com isto, dentre todos os tratamentos, houve aumento da temperatura retal registrada ($P \leq 0.02$) das 2h até 6h, aumento da concentração plasmática de haptoglobina ($P \leq 0.05$) das 16h até 96h, e aumento das concentrações de TNF α e da expressão de mRNA para TNF α e COX2 no sangue ($P < 0,01$) às 2h relativas ao momento de aplicação do desafio de LPS (Tabela 3).

Entretanto, administração oral de meloxicam falhou na tentativa de mitigar estes resultados (Tabela 2), o que de fato não suporta a hipótese abordada dado que meloxicam é capaz de modular a enzima COX2 e subsequentes respostas inflamatória e de fase-aguda (Beretta *et al.*, 2005). Estes resultados também diferem de estudos anteriores que demonstraram que componentes anti-inflamatórios reduziram as respostas imunológicas provocadas por infusão de LPS em bovinos (Lohuis *et al.*, 1991; Wagner & Apley, 2004; Myers *et al.*, 2010), assim como estudos que relataram redução nas variáveis inflamatórias e de fase-aguda quando meloxicam foi administrado via oral para bovinos de corte submetidos à situação de estresse (Guarnieri Filho *et al.*, 2014; Van Engen *et al.*, 2014).

Nenhum efeito de tratamento foi detectado ($P \geq 0.74$) para concentrações de cortisol, insulina e leptina (Tabela 2). Efeitos de tempo foram detectados ($P < 0,01$) para todas estas variáveis (Tabela 3), indicando que a administração de LPS alterou as respostas metabólicas dos animais de acordo com o resultado de outros autores (Reuter *et al.*, 2008; Carroll *et al.*, 2009; Waggoner *et al.*, 2009), enquanto que a administração de meloxicam não teve impacto sobre estes resultados. O cortisol regula as primeiras respostas fisiológicas após um estímulo patogênico, como por exemplo a administração de LPS, no papel de molécula chave para as reações pro-inflamatórias e de fase-aguda seguintes. (Steiger *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2009; Cooke *et al.*, 2012).

A síntese de insulina e leptina aumenta durante a resposta inflamatória (Eizirik *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 2001; Roelfsema *et al.*, 2001) no intuito de elevar a utilização de energia pelo corpo para restabelecer a homeostase (Waggoner *et al.*, 2009). Leptina também está envolvido com a maturação e ativação de leucócitos e subsequente síntese de citocinas pro-inflamatórias (Matarese *et al.*, 2005; Fernández-Riejos *et al.*, 2010). Portanto, houve aumento na concentração de cortisol plasmático ($P \leq 0.03$) das 2h até 4h, de insulina plasmática ($P \leq 0.05$) das 2h até 8h, e de leptina plasmática ($P \leq 0.04$) das 12h até 16h após administração de LPS, em todos os grupos tratados (Tabela 3).

Ao contrário do que foi encontrado, compostos anti-inflamatórios têm mostrado afetar as concentrações de cortisol e insulina circulantes na corrente sanguínea de bovinos durante um processo inflamatório (Cooke *et al.*, 2012; Farney *et al.*, 2013). Porém, Guarnieri Filho *et al.* (2014) e Van Engen *et al.* (2014) também relataram que

administração oral de meloxicam para bovinos de corte submetidos a situações estressantes não afeta a concentração de cortisol circulante. O Experimento 1 não encontrou evidências de que administração oral de meloxicam, nas doses e intervalos utilizados neste estudo, previne ou pelo menos aliviam as reações metabólicas, inflamatórias e de fase-agua provocadas pela administração de LPS à 0,5 µg/kg PC para bovinos de corte. Talvez a resposta biológica causada pela infusão de LPS tenha sobrecarregado a capacidade anti-inflamatória de MEL1 e MEL8, uma vez que os níveis de haptoglobina tiveram um pico aproximadamente duas vezes maior que o obtido por Guarnieri Filho et al. (2014). Ou talvez estes tratamentos impactaram respostas imunológicas não avaliadas no presente experimento, como a síntese e concentrações de eicosanoides e bradicinina (Myers *et al.*, 2010). Por esse motivo, ainda se faz necessário maiores estudos para se esclarecer os impactos de meloxicam nas reações do sistema imune inato de bovinos, induzidas por agentes patogênicos ou estresse.

4.2 - Experimento 2

Nenhum efeito de tratamento foi detectado ($P \geq 0.29$) para temperatura retal, concentração sérica de TNF α e concentração plasmática de haptoglobina (Tabela 4). Efeitos de tempo foram detectados ($P < 0,01$) para temperatura retal e concentração de haptoglobina no plasma, mas não para concentração sérica de TNF α ($P = 0,97$). A vacina aplicada neste experimento continha uma preparação com cepas de vírus vivo modificado, produtos de culturas inteiras de *M. haemolytica*, e uma formulação própria de adjuvante (Zoetis) para promover maior proteção imunológica contra os antígenos (McKee *et al.*, 2007; Coffman *et al.*, 2010). A fração do vírus e os adjuvantes estimulam o recrutamento de leucócitos de reconhecimento de antígenos até o local de aplicação da vacina, que por sua vez sintetizam citocinas pró-inflamatórias e estimulam respostas inflamatórias e de proteínas de fase-aguda (Heegaard *et al.*, 2000; Tizard, 2004; Carroll and Forsberg, 2007). E de acordo com isso, com os tratamentos foi registrado o aumento da temperatura retal ($P \leq 0.05$) das 2 até 48h, e elevação da concentração plasmática de haptoglobina ($P \leq 0.05$) das 16 até 144h relativas ao momento de aplicação da vacina (Tabela 5), indicando que a vacinação contra patógenos respiratórios estimulou uma resposta do sistema imune inato (Carroll & Forsberg, 2007), como mostrado

anteriormente (Arthington *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2015). Rodrigues *et al.* (2015) também sugeriram que a vacinação contra patógenos respiratórios não apresenta um pico de aumento na concentração sérica de TNF α em até 6h após a aplicação, que foi o intervalo de amostragem adotado para esta variável com base em estudos anteriores com administração de LPS (Carroll *et al.*, 2009). Apesar disso, assim como no Experimento 1, a administração de meloxicam falhou na tentativa de mitigar o aumento de temperatura retal e haptoglobina plasmática induzidas pela vacina, diferindo da hipótese baseada nas propriedades anti-inflamatórias de meloxicam (Beretta *et al.*, 2005; Guarnieri Filho *et al.*, 2014; Van Engen *et al.*, 2014).

Nenhum efeito de tratamento foi encontrado ($P \geq 0.46$) para concentrações de cortisol, insulina e leptina no plasma (Tabela 4). Em todos os tratamentos foram detectados efeitos de tempo ($P < 0.01$) para todas estas variáveis (Tabela 5), dado que concentrações de cortisol aumentaram ($P \leq 0.05$) de 4 até 16h, enquanto que as de insulina e leptina se mantiveram elevadas ($P \leq 0.04$) de 8 até 16h relativas à aplicação da vacina (Tabela 5). Rodrigues *et al.* (2015) também reportaram aumentos transitórios até 16h nas concentrações de cortisol, insulina e leptina em bovinos de corte após vacinação contra patógenos respiratórios, e atribuíram estes resultados às funções imunorreguladoras e homeostáticas desses hormônios durante reações inflamatórias (Steiger *et al.*, 1999; Matarese *et al.*, 2005; Waggoner *et al.*, 2009). Assim, no presente estudo a vacinação contra patógenos respiratórios alterou os parâmetros metabólicos em bovinos, como esperado (Rodrigues *et al.*, 2015), e a administração de meloxicam não afetou estes resultados assim como no Experimento 1. Títulos de anticorpos neutralizantes dão uma indicação de proteção imunológica, prevenção de doenças, e eficácia de vacina em bovinos (Howard *et al.*, 1989; Bolin and Ridpath, 1990; Richeson *et al.*, 2008).

Com base na hipótese de que os efeitos de meloxicam sobre os leucócitos responsáveis pelas reações inflamatórias e de fase-aguda, que são diretamente ligadas com a apresentação de antígenos às células T (Durum and Muegge, 1996), tais títulos de anticorpos neutralizantes contra os patógenos respiratórios foram avaliados para determinar se os tratamentos afetariam a eficácia da vacina. Nenhum efeito de tratamento foi detectado ($P \geq 0.26$) para concentrações séricas de anticorpos contra *M. haemolytica* ou títulos contra BRSV, BHV-1, BVD-1, e PI3 (Tabela 4), corroborando para a ausência de efeito de tratamento nas respostas metabólica, inflamatória e de proteínas de fase-

aguda. Efeito de tempo foi detectado ($P < 0,01$) para todas as variáveis (Tabela 6) exceto para títulos de BVD-1 ($P = 0,40$). Como esperado, concentrações de anticorpos de *M. haemolytica* e títulos contra BRSV, BHV-1, e PI3 aumentaram ($P \leq 0,04$) dentre todos os tratamentos quando comparadas as amostras coletadas antes (0h) e depois da vacinação (168, 240 e 336h; Tabela 6). A ausência de efeito de tempo ($P = 0,40$) na concentração sérica de títulos contra BVD-1 foi inesperada, mas pode ser atribuída ao fato de que, provavelmente, os títulos de BVD-1 se elevaram na vacinação realizada no d -21 (Dean *et al.*, 2003; Fairbanks *et al.*, 2004).

Em resumo, o Experimento 2 não encontrou nenhuma evidência de que administração oral de meloxicam, nas doses e intervalos adotados neste estudo, mitigaram as reações metabólicas, inflamatórias e de fase-agua provocadas pela vacinação contra patógenos respiratórios e nem afetaram as concentrações séricas de títulos de anticorpos contra estes patógenos. Como no Experimento 1, talvez a vacinação provoca respostas biológicas que sobrecarregam a capacidade anti-inflamatória de MEL1 e MEL8 pois o pico de concentração de Haptoglobina foi cerca de quatro vezes maior que o registrado por Guarnieri Filho *et al.* (2014), ou estes tratamentos influenciam respostas imunológicas inatas não avaliadas no presente experimento (Myers *et al.*, 2010).

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007.

ANDERSSON, A. K.; FLODSTROM, M.; SANDLER, S. Cytokineinduced inhibition of insulin release from mouse pancreatic β -cells deficient in inducible nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 281, p. 396–403. 2001 doi:10.1006/ bbrc.2001.4361.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. 2006

ARTHINGTON, J. D. et al. Effects of vaccination on the acute-phase protein response and measures of performance in growing beef calves. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 91, n. 4, p.1831-1837, 23 jan. 2013.

ARTHINGTON, J. D.; SPEARS, J. W.; MILLER, D. C. The effect of early weaning on feedlot performance and measures of stress in beef calves. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 83, n. 4, p.933-939, jan. 2005.

BERETTA, C.; GARAVAGLIA, G.; CAVALLI, M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: An in vitro analysis. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.302-306, out. 2005.

BOLIN, S. R.; J. F. RIDPATH. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus-vaccines. **American Journal of Veterinary Research** v.51, p.703–707, 1990.

BURCIAGA-ROBLES, L. O. et al. Effects of exposure to calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus type 1b and subsequent infection with Mannheimia haemolytica on clinical signs and immune variables: Model for bovine respiratory disease via viral and bacterial interaction. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.2166-2178, 12 fev. 2010

CARROLL, J. A.; N. E. FORSBERG. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.23, p.105–149, 2007.

CARROLL, J. A. et al. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.81-89, 1 abr. 2009.

COETZEE, J. F., B. KUKANICH, R. MOSHER, e P. S. ALLEN. Pharmacokinetics of intravenous and oral meloxicam in ruminant calves. **Veterinary Therapeutics**. v. 10, p.E1–E8, 2009.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.492-503, out. 2010.

CONFER, A. W. et al. Antibody responses to outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A:3. **American Journal of Veterinary Research**. v.57, p.1452–1457. 1996.

COOKE, R. F.; ARTHINGTON, J. D. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA or a colorimetric method based on peroxidase activity. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.531-536, 5 abr. 2012

COOKE, R. F.; BOHNERT, D. W. Technical note: Bovine acute-phase response after corticotrophin-release hormone challenge. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.252-257, 24 set. 2010.

COOKE, R. F. et al. Effects of supplementation frequency on performance, reproductive, and metabolic responses of Brahman-crossbred females. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 86, n. 9, p.2296-2309, 29 fev. 2008.

COOKE, R. F. et al. Bovine acute-phase response after different doses of corticotropin-releasing hormone challenge. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 90, n. 7, p.2337-2344, 13 jan. 2012.

DEAN, H. J. et al. Prevention of persistent infection in calves by vaccination of dams with noncytopathic type-1 modified-live bovine viral diarrhea virus prior to breeding. **American Journal Of Veterinary Research**, [s.l.], v. 64, n. 5, p.530-537, maio 2003.

DELAVAUD, C. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. **Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 165, n. 2, p.519-526, 1 maio 2000.

DURUM, S. K.; K. MUEGGE. Cytokines linking the immune and inflammatory systems: IL-1, TNF, IL-6, IFN- α , and TGF- β . In: R. R. RICH, T. A. et al, **Clinical immunology, principles and practice**. Mosby, St. Louis, MO. p. 350. 1996.

EDWARDS, T.A. Control Methods for Bovine Respiratory Disease for Feedlot Cattle. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.273-284, jul. 2010.

EIZIRIK, D. L. et al. Interleukin-1 β -induced stimulation of insulin release in mouse pancreatic islets is related to diacylglycerol production and protein kinase C activation. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 111, n. 2, p.159-165, jun. 1995.

FAIRBANKS, K. K. et al. Evaluation of fetal protection against experimental infection with type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus after vaccination of the dam with a bivalent modified-live virus vaccine. **Journal Of The American Veterinary Medical Association**, [s.l.], v. 225, n. 12, p.1898-1904, dez. 2004.

FARNEY, J. K. et al. Anti-inflammatory salicylate treatment alters the metabolic adaptations to lactation in dairy cattle. **Ajp: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 305, n. 2, p.110-117, 15 maio 2013.

FERNÁNDEZ-RIEJOS, P. et al. Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2010, p.1-8, 2010.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects Of Medicine**, [s.l.], v. 27, n. 2-3, p.126-139, abr. 2006.

GUARNIERI FILHO, T. A. et al. Effects of meloxicam administration on physiological and performance responses of transported feeder cattle. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 92, n. 9, p.4137-4144, 14 jul. 2014.

HEEGAARD, P. M. H. et al. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [s.l.], v. 77, n. 1-2, p.151-159, nov. 2000.

HOWARD, C. J.; CLARKE, M. C.; BROWNLIE, J. Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.195-203, mar. 1989.

JOHNSON, R. W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.1244-1255, jan. 1997

LOHUIS, J. A. C. M. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in healthy cows and cows with *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.219-229, set. 1991.

MATARESE, G.; MOSCHOS, S.; MANTZOROS, C. S. Leptin in Immunology. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 174, n. 6, p.3137-3142, 4 mar. 2005.

MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W.; MARRACK, P. How Do Adjuvants Work? Important Considerations for New Generation Adjuvants. **Immunity**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.687-690, nov. 2007.

MYERS, M. J. et al. Biomarkers of inflammation in cattle determining the effectiveness of anti-inflammatory drugs. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1-8, fev. 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7 rev. ed. Washington, DC.: National Academy Press, 2000. 242p.

OCÓN-GROVE, O. M. et al. Ovine endometrial expression of fibroblast growth factor (FGF) 2 and conceptus expression of FGF receptors during early pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.135-145, fev. 2008.

REUTER, R. R. et al. Effects of dietary energy source and level and injection of tilmicosin phosphate on immune function in lipopolysaccharide-challenged beef steers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 86, n. 8, p.1963-1976, 11 abr. 2008.

RICHESON, J. T. et al. Effects of on-arrival versus delayed modified live virus vaccination on health, performance, and serum infectious bovine rhinotracheitis titers of newly received beef calves. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 86, n. 4, p.999-1005, 11 jan. 2008. American Society of Animal Science (ASAS). <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2007-0593>.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus* α -toxin. **Inflamm Res.**, [s.l.], v. 49, n. 9, p.486-496, set. 2000.

RODRIGUES, M. C. et al. Effects of vaccination against respiratory pathogens on feed intake, metabolic, and inflammatory responses in beef heifers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 93, n. 9, p.4443-4452, 2015.

ROELFSEMA, V. The metabolic effects of endotoxin are differentially affected by the pattern of GH administration in the rat. **Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 171, n. 1, p.173-181, 1 out. 2001.

ROSENBAUM, M. J.; EDWARDS, E. A.; SULLIVAN, E. V. Micromethods for respiratory virus sero-epidemiology. **Health Laboratory Science**. v.7: p.42-52, 1970.

SILVA, E. et al. Blood COX-2 and PGES gene transcription during the peripartum period of dairy cows with normal puerperium or with uterine infection. **Domestic Animal Endocrinology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.314-323, out. 2008.

STEIGER, M et al. Effect of a prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 77, n. 9, p. 2523-2532, mar. 1999.

TIZARD, I. R. Vaccines and their production. In: T. MERCHANT, editor, **Veterinary immunology**. 7^a ed. Elsevier, Philadelphia, PA., Estados Unidos, p. 247, 2004.

VAN ENGEN, N. K. et al. Impact of oral meloxicam on circulating physiological biomarkers of stress and inflammation in beef steers after long-distance transportation. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 92, n. 2, p.498-510, 14 jan. 2014.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 74, n. 10, p.3583-3597, out. 1991.

WAGGONER, J. W. et al. Effects of dietary protein and bacterial lipopolysaccharide infusion on nitrogen metabolism and hormonal responses of growing beef steers. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 87, n. 11, p.3656-3668, 31 jul. 2009.

WAGNER, S. A.; APLEY, M. D. Effects of two anti-inflammatory drugs on physiologic variables and milk production in cows with endotoxin-induced

mastitis. **American Journal Of Veterinary Research**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.64-68, jan. 2004.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. R. St. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science And Technology**, [s.l.], v. 39, n. 1-2, p.95-110, nov. 1992.

TABELAS

Tabela 1. Sequências de *Primers* e número de acesso para todas as transcrições de genes analisados via PCR quantitativo em tempo real no Exp. 1.

Gene alvo	Sequência do <i>Primer</i> ¹	Núm. de Acesso
β 2-microglobulina		NM_173893
Sequência	5'-GGGCTGCTGTCGCTGTCT-3'	
Reverso	5'-TCTTCTGGTGGGTGTCTTGAGT-3'	
Cicloxygenase-2		AF031699
Sequência	5'-AATCATTACCAGGCAAAGG-3'	
Reverso	5'-TAGGGCTTCAGCAGAAAACG-3'	
Fator de Necrose Tumoral α		NM_173966
Sequência	5'-AACAGCCCTCTGGTTCAAAC-3'	
Reverso	5'-TCTTGATGGCAGACAGGATG-3'	

¹Sequências de *Primers* obtidas de Silva et al. (2008) para β 2-microglobulina e cicloxygenase-2, e de Riollot et al. (2000) para Fator de Necrose Tumoral α (TNF α).

Tabela 2. Respostas metabólicas, inflamatórias, e expressão de mRNA no sangue de Novilhos (n=11) e Novilhas (n=10) que receberam infusão de Lipopolissacarídeo Bacteriano (LPS; 0,5 µg/ kg de PC) e selecionados para receber meloxicam via oral (1 mg/kg de PC diariamente) por 7 d (MEL8; n = 7), monodrato de lactose por 7 d (CON; n = 7), ou meloxicam por 1 d e monodrato de lactose por 6 d (MEL1; n = 7)¹

Item	CON	MEL8	MEL1	SEM	P-valor
Respostas Metabólicas e Inflamatórias					
Temperatura Retal, ² °C	38,99	38,95	38,96	0,07	0,90
Cortisol (plasma), ng/mL	30,4	30,6	30,1	2,70	0,98
Insulina (plasma), µUI/mL	2,72	3,04	2,75	0,66	0,93
Leptina (plasma), ng/mL	4,89	4,93	5,23	0,34	0,74
Haptoglobina (plasma), µg/mL	260	290	280	0,05	0,95
TNFα ³ (soro), ng/mL	0,96	1,31	1,39	0,43	0,75
Expressão de mRNA no sangue					
Expressão de TNFα, mudança de <i>fold</i> .	3,70	3,15	2,76	0,44	0,36
Expressão de COX2 ⁴ , mudança de <i>fold</i> .	6,90	9,63	9,92	3,78	0,82

¹ Meloxicam e monodrato de lactose foram misturados manualmente com Solução Salina 0,9% e administrados individualmente nos animais via oral às 08h00 do d -1 até d 6 do experimento. No d 0, todos os animais receberam *bolus* de LPS bacteriano (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) juntamente com a administração do tratamento (Carroll et al., 2009).

² Temperatura retal dos animais foi aferida (Termômetro digital GLA M750; GLA Agricultural Electronics, San Luis Obispo, CA, EUA), e amostras de sangue coletadas a cada 2 horas desde -2h até 8h, a cada 6 horas da 12h até 24h, a cada 12 horas da 36h até 72h, e a cada 24 horas da 96h até 144h relativas à aplicação de LPS.

³TNFα = Fator de Necrose Tumoral Alfa

⁴ COX2 = Cicloxigenase-2

Tabela 3. Temperatura Retal (RTEMP), concentrações plasmáticas de cortisol, insulina, leptina, haptoglobina, e Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) sérico, e expressão de mRNA no sangue (mudança de *fold*) para TNF α e ciclooxigenase-2 (COX2) em bovinos de corte (novilhos, n = 11; novilhas, n = 10) em desafio de lipopolissacarídeo bacteriano (0,5 μ g/kg PC)¹

Hora	RTEMP, °C	Cortisol, ng/mL	Insulina, μ UI/mL	Leptina, ng/mL	Haptoglobina, μ g/mL	TNF α , ng/mL	TNF α RNAm	COX2 RNAm
-2	39,09 ^c	33,8 ^c	1,57 ^{d,e}	4,94 ^b	104 ^e	—	—	—
0	39,11 ^c	22,7 ^{e,d}	1,47 ^{d,e}	4,84 ^b	79 ^e	0,26 ^b	2,10 ^b	3,60 ^b
2	39,72 ^b	46,9 ^b	7,01 ^a	4,78 ^b	163 ^{d,e}	2,86 ^a	4,98 ^a	19,60 ^a
4	40,77 ^a	55,6 ^b	5,67 ^{a,b}	4,87 ^b	156 ^{d,e}	0,54 ^b	2,56 ^b	2,55 ^b
6	39,54 ^b	37,5 ^c	4,96 ^b	4,93 ^b	109 ^e	0,31 ^b	—	—
8	39,12 ^c	21,2 ^{e,d}	3,37 ^c	5,04 ^b	129 ^e	—	—	—
12	38,92 ^{d,c,e}	24,3 ^{e,d}	2,85 ^{d,c}	5,56 ^a	158 ^{d,e}	—	—	—
16	38,82 ^{d,f,a}	20,0 ^e	1,53 ^{d,e}	5,38 ^a	272 ^{d,c}	—	—	—
24	38,33 ^h	22,9 ^{e,d}	0,99 ^e	4,96 ^b	497 ^b	—	—	—
36	38,83 ^{d,e}	23,6 ^{e,d}	0,98 ^e	5,02 ^b	580 ^a	—	—	—
48	38,76 ^{d,e,f,e}	25,7 ^d	0,82 ^e	4,92 ^b	615 ^a	—	—	—
60	38,97 ^{c,d}	—	—	—	431 ^b	—	—	—
72	38,51 ^{h,g}	—	—	—	431 ^b	—	—	—
96	37,99 ⁱ	—	—	—	332 ^c	—	—	—
120	38,66 ^{g,f,e}	—	—	—	223 ^{d,e}	—	—	—
144	38,56 ^{h,g,f}	—	—	—	162 ^{d,e}	—	—	—
SEM	0,1	2,40	0,65	0,22	52	0,32	0,34	2,90
P-valor	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

^{a-h} dentro colunas, valores com diferentes superscritos diferem estatisticamente (P \leq 0,05)

¹Animais receberam bolus intravenoso de Lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na 0 h, que foi dissolvido em 10 mL de Solução Salina 0,9% imediatamente antes da administração. A temperatura retal dos animais foi aferida (Termômetro digital GLA M750; GLA Agrícola Eletrônica, San Luis Obispo, CA, EUA), e amostras de sangue coletadas a cada 2 horas desde -2h até 8h, a cada 6 horas da 12h até 24h, a cada 12 horas da 36h até 72h, e a cada 24 horas da 96h até 144h relativas à aplicação de LPS.

Tabela 4. Variáveis metabólicas, inflamatórias, e anticorpos séricos de Novilhos (n=11) e Novilhas (n=10) vacinados contra patógenos causadores de doenças respiratórias e selecionados para receber meloxicam via oral (1 mg/kg de PC diariamente) por 7 d (MEL8; n = 7), monoidrato de lactose por 7 d (CON; n = 7), ou meloxicam por 1 d e monoidrato de lactose por 6 d (MEL1; n = 7).¹

Item	CON	MEL8	MEL1	SEM	P-valor
Respostas Metabólicas e Inflamatórias					
Temperatura Retal, °C	39,19	39,06	39,13	0,06	0,29
Cortisol (plasma), ng/mL	26,60	26,10	24,40	1,60	0,61
Insulina (plasma), µIU/mL	1,84	1,92	1,91	0,38	0,98
Leptina (plasma), ng/mL	5,00	5,29	5,44	0,25	0,46
Haptoglobina (plasma), µg/mL	570	520	560	0,09	0,92
TNFα (soro), ng/mL	0,15	0,20	0,26	0,07	0,57
Anticorpos séricos					
<i>Mannheimia haemolytica</i> , ng/anticorpo ligado	0,87	0,70	0,96	0,17	0,53
Vírus Sincicial Bovino, título log2	1,70	1,57	1,32	0,22	0,26
Herpesvírus bovino-1, título log2	0,79	0,66	0,75	0,28	0,90
Diarreia viral bovina virus-1, título log2	1,35	1,45	1,17	0,21	0,62
Vírus Parainfluenza-3, título log2	1,52	1,01	1,25	0,27	0,29

¹ Meloxicam e monoidrato de lactose foram misturados manualmente com Solução Salina 0,9% e administrados individualmente nos animais via oral às 08h00 do d 7 até d 13 do experimento. No d -21, todos os animais foram vacinados contra *Costridium* (2 mL injeção subcutânea [s.c.] de One Shot Ultra 7; Zoetis, Florham Park, NJ, EUA), vírus parainfluenza-3, vírus causador de Rinotraqueite Infecciosa Bovina, diarreia viral bovina - vírus tipos 1 e 2, e *Mannheimia haemolytica* (2 mL injeção s.c. de Bovi-Shield Gold One Shot; Zoetis) concomitantemente com administração dos tratamentos. A temperatura retal dos animais foi aferida (Termômetro digital GLA M750; GLA Agricultural Eletronics, San Luis Obispo, CA, EUA), e amostras de sangue coletadas a cada 2 horas desde -2h até 8h, a cada 6 horas da 12h até 24h, a cada 12 horas da 36h até 72h, e a cada 24 horas da 96h até 168h e às 240h e 336h relativas à aplicação da vacina no d8.

Tabela 5. Temperatura Retal (RTEMP), concentrações plasmáticas de cortisol, insulina, leptina, haptoglobina, e Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) sérico, em bovinos de corte (novilhos, n = 11; novilhas, n = 10) vacinados contra patógenos causadores de doenças respiratórias.¹

Hora	RTEMP, °C	Cortisol, ng/mL	Insulina, μ UI/mL	Leptina, ng/mL	Haptoglobina, μ g/mL	TNF α , ng/mL
-2	38,56 ^{i,j,k}	22,5 ^{e,f,g}	1,26 ^{f,g}	5,06 ^{d,e,f}	176 ^h	—
0	38,69 ^{g,h,i}	18,4 ^g	1,50 ^{d,e,f,g}	4,74 ^f	285 ^{g,h}	0,23
2	39,54 ^d	19,8 ^{e,f,g}	1,20 ^g	5,07 ^{d,e,f}	181 ^h	0,20
4	39,84 ^{c,b}	33,5 ^a	1,67 ^{d,e,f}	4,98 ^{d,e,f}	241 ^{g,h}	0,19
6	40,17 ^a	30,6 ^{a,b}	1,93 ^{c,d,e}	4,89 ^{e,f}	191 ^h	0,19
8	40,30 ^a	29,2 ^{a,b,c}	2,32 ^{b,c}	5,64 ^{b,c}	258 ^{g,h}	—
12	39,94 ^b	28,1 ^{b,c,d}	2,70 ^{a,b}	6,14 ^a	405 ^{f,g}	—
16	39,47 ^d	27,3 ^{b,c,d}	3,10 ^a	5,73 ^b	502 ^{e,f}	—
24	39,02 ^{e,f}	25,5 ^{c,d,e}	1,81 ^{d,e}	5,29 ^{c,d}	870 ^{c,d}	—
36	39,65 ^{c,d}	23,9 ^{d,e,f}	1,94 ^{c,d,e}	5,24 ^{c,d,e}	1049 ^{a,b}	—
48	39,08 ^e	24,2 ^{d,e,f}	1,40 ^{e,f,g}	4,94 ^{e,f}	1098 ^{a,b}	—
60	38,62 ^{h,i,j}	—	—	—	1108 ^{a,b}	—
72	38,41 ^k	—	—	—	1205 ^a	—
96	38,87 ^{e,f,g}	—	—	—	976 ^{b,c}	—
120	38,45 ^{j,k}	—	—	—	695 ^{d,e}	—
144	38,79 ^{f,g,h}	—	—	—	518 ^{e,f}	—
168	38,52 ^{i,j,k}	—	—	—	262 ^{g,h}	—
240	38,52 ^{i,j,k}	—	—	—	241 ^{g,h}	—
336	39,08 ^e	—	—	—	238 ^{g,h}	—
SEM	0,09	1,8	0,28	0,19	90	0,04
P-valor	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,97

^{a-h} dentre colunas, valores com diferentes superscritos diferem estatisticamente (P \leq 0.05)

¹Os animais foram revacinados contra vírus parainfluenza-3, vírus sincicial respiratório bovino, diarréia viral bovina vírus tipos 1 e 2, e *Mannheimia haemolytica* (2 mL injeção s.c. de Bovi-Shield Gold One Shot; Zoetis, Florham Park, NJ, EUA) na 0h do d 8. A temperatura retal dos animais foi aferida (Termômetro digital GLA M750; GLA Agricultural Electronics, San Luis Obispo, CA, EUA), e amostras de sangue coletadas a cada 2 horas desde -2h até 8h, a cada 6 horas da 12h até 24h, a cada 12 horas da 36h até 72h, e a cada 24 horas da 96h até 168h e às 240h e 336h relativas à aplicação da vacina.

Tabela 6. Concentrações séricas de anticorpos contra *Mannheimia haemolytica*, e títulos contra vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), Herpesvirus bovino-1 (BHV-1), diarreia viral bovina virus-1 (BVD-1), e vírus parainfluenza-3 (PI3), em bovinos de corte (novilhos, n = 11; novilhas, n = 10) vacinados contra patógenos causadores de doenças respiratórias.¹

Hora	M. haemolytica	BRSV	BHV-1	BVD-1	PI3
0	0,61 ^c	1,03 ^b	0,22 ^c	1,27	0,64 ^b
168	0,82 ^b	1,65 ^a	0,65 ^b	1,31	1,42 ^a
240	1,00 ^a	1,80 ^a	1,05 ^a	1,38	1,45 ^a
336	0,87 ^b	1,64 ^a	1,03 ^a	1,33	1,54 ^a
SEM	0,1	0,11	0,15	0,12	0,15
P-valor	<0,01	<0,02	<0,03	0,40	<0,05

^{a-h} dentre colunas, valores com diferentes superscritos diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$)

¹Os animais foram revacinados contra vírus parainfluenza-3, vírus sincicial respiratório bovino, diarreia viral bovina virus tipos 1 e 2, e *M. haemolytica* (2 mL injeção s.c. de Bovi-Shield Gold One Shot; Zoetis, Florham Park, NJ, EUA) na 0h. A temperatura retal dos animais foi aferida (Termômetro digital GLA M750; GLA Agricultural Electronics, San Luis Obispo, CA, EUA), e amostras de soro coletadas nas horas 0h, 168h, 240h e 336h relativas à aplicação da vacina (0h).

Capítulo III

1. Implicações

Pelo fato de não ter sido detectado efeitos de tratamentos nas dosagens e intervalos de aplicação adotados neste estudo, ainda são necessários mais esforços para desenvolver estratégias que mitiguem respostas inflamatórias e de fase aguda conhecidas por prejudicar o desempenho animal, mantendo ou melhorando a proteção imunológica em bovinos vacinados contra patógenos respiratórios, incluindo avaliação de outras doses de meloxicam ou de diferentes medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides.