

Efeitos do estresse da orquiectomia na citologia broncoalveolar de bezerros da raça Holandesa¹

Jessyca Beraldi Bellinazzi², Heloisa Godoi Bertagnon³, Camila Freitas Batista⁴, Bruna Parapinski dos Santos⁴, Maria Gabriela Barbosa Lima⁴, Daniel Magalhães Lima², Fernando Jose Benesi⁵ e Alice Maria Melville Della Libera^{5*}

ABSTRACT.- Bellinazzi J.B., Bertagnon H.G., Batista C.F., Santos B.P., Lima M.G.B., Lima D.M., Benesi F.J. & Della Libera A.M.M. 2013. [Effects of the stress of orchectomy on bronchoalveolar cytology of Holstein Calves.] Efeitos do estresse da orquiectomia na citologia broncoalveolar de bezerros da raça Holandesa. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(Supl.1):93-98. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: dellalibera@usp.br

The recognition of the impact of certain forms of stress in the animal well being and organic equilibrium, represents a challenge to the adoption of good practices. Thus, this research verified the impact of a painful routine of the cattle husbandry can cause on pulmonary and systemic immunity. Was evaluated hemogram and cortisol, in four moments, being M1, M6, M7 e M8 (respectively seven days before and one, three and eight days after the painful challenge) and bronchoalveolar cytology, obtained by bronchoscopy, in the moments of M1, M6 e M8. There was a reduction of the erythrogram values in the first day after the challenge, compatible with the anaplasmosis and aggravated by the blood loss during the surgery and an influx of leukocytes to the pulmonary region. Eight days after the challenge, became evident the cortisol increase, generating leukocytosis by neutrophilia and monocytosis in the blood with a probable reduction of chemotaxis to the lungs, turning the respiratory tract potentially more susceptible to infections, suggesting that this practice, even accompanied by analgesic protocol, increases the risk of pneumonia, affecting the animal well-being.

INDEX TERMS: Stress, orchectomy, immunity, cattle, cortisol, macrophage, respiratory tract, pneumonia.

RESUMO.- A identificação do impacto que certas formas de estresse causam ao bem estar animal e equilíbrio orgânico, representa um desafio á adoção de boas práticas de criação. Assim, a presente pesquisa verificou o impacto de

um desafio doloroso rotineiro dos bovinos na imunidade pulmonar e sistêmica. Avaliou-se hemograma e cortisol, em quatro momentos, sendo M1, M6, M7 e M8 (respectivamente sete dias antes e um, três e oito dias depois do desafio doloroso) e citologia broncoalveolar, obtida por broncoscopia, nos momentos M1, M6 e M8. Houve uma redução dos valores do eritrograma no primeiro dia após o desafio, compatível com anaplasmosose e agravada pela perda de sangue durante a cirurgia e um influxo de leucócitos para a região pulmonar. Oito dias após o desafio, evidenciou-se aumento de cortisol, gerando uma leucocitose por neutrofilia e monocitose no sangue com provável redução de quimiotaxia para o pulmão, tornando o trato respiratório potencialmente mais susceptível a infecções, sugerindo que esta prática de manejo, mesmo acompanhado de protocolo analgésico, pode ser considerada um fator de risco a pneumonias afetando o bem estar animal.

¹ Recebido em 10 de setembro de 2013.

Aceito para publicação em 3 de dezembro de 2013.

² Graduando de iniciação científica do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

³ Docente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro) e Doutoranda do Departamento de Clínica Médica, FMVZ-USP, São Paulo, SP.

⁴ Pos-graduandos do Departamento de Clínica Médica, FMVZ-USP, São Paulo, SP.

⁵ Docente do Departamento de Clínica Médica, FMVZ-USP, São Paulo, SP.
*Autor para correspondência: dellalibera@usp.br

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estresse, orquiectomia, bovinos, cortisol, imunidade, macrófago, pneumonia, trato respiratório

INTRODUÇÃO

Bem estar animal é um termo frequentemente utilizado, e corresponde ao respeito a biologia dos animais de produção, garantindo sua sanidade mental e corporal (Broom & Molento 2004, Broom 2005). Na busca do aperfeiçoamento do manejo animal racional, uma série de sistemas e técnicas de criação foi desenvolvida visando aumentar a produtividade, ignorando-se aspectos intrínsecos dos animais, como a dor e o estresse (Paranhos da Costa & Cromberg 1997).

Animais de produção habitualmente vivenciam processos dolorosos, como castração, mochação e vacinações (Grandin 2010) os quais podem promover alterações fisiológicas culminando em secreção aumentada de aldosterona, cortisol e catecolaminas (Fantoni & Mastrocinque 2002, Fitzpatrick et al. 2006, Thuer et al. 2007). Acarretando em perda de peso, predisposição de animais às doenças, atraso no crescimento e prejuízos reprodutivos (Paranhos da Costa & Cromberg 1997, Fitzpatrick et al. 2006, Raidal et al. 1997).

Avaliar o efeito do estresse sobre os índices de produção pode não identificar qual o sistema mais afetado e consequentes variações à susceptibilidade destes às doenças. Apesar disto, já foi demonstrado que situações estressantes como transporte ou extremos de temperatura podem interferir na defesa do trato respiratório, alterando a citologia local, diminuindo a ativação e poder de fagocitose de macrófagos alveolares e o metabolismo oxidativo de neutrófilos (Raidal et al. 1997, Ishizaki et al. 2005, Bertagnon et al. 2011), permitindo supor que outras práticas rotineiras durante o manejo dos bovinos também possam facilitar a ocorrência de afecções respiratórias.

Doenças respiratórias, como broncopneumonia enzoótica, uma das maiores causas de perdas econômicas na bovinocultura (Gonçalves et al. 2000, Ackermann et al. 2010), são eventos constantes após castrações e embora esta alta correlação já tenha sido observada (Snowder et al. 2006), não há trabalhos verificando a influência de desafios dolorosos na imunidade do trato respiratório.

Sabendo-se que a defesa inicial do trato respiratório evoca as células residentes, que mobilizaram outras células do sangue (Ackermann et al. 2010), a presente hipótese foi que o desafio doloroso mesmo acompanhado de protocolo analgésico, altera o perfil citológico do trato respiratório e o hemograma, com consequente prejuízo da resposta imunológica e favorecimento de pneumonias, refletindo um estado de mal estar animal. Dessa forma, o presente trabalho verificou a influência do protocolo proposto de orquiectomia na imunidade de bezerros por meio de avaliações hematológicas e citológicas do trato respiratório, correlacionando-as com os teores séricos de cortisol.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas orquiectomias em oito bezerros da raça holandesa, sadios, provenientes de propriedades próximas a São Paulo, aclimatados em baias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, entre o 180º e 270º dias de vida. A garantia da higidez dos animais, no início do período experimental, foi verificada por meio de exames físico e complementares (broncoscopia e hemograma).

Foi realizada a orquiectomia pela técnica aberta e com ligadura do funículo espermático de acordo com o preconizado por An-

derson (2007) após prévia antisepsia e anestesia local infiltrativa com lidocaína sem vasoconstritor a 2%, 10 minutos antes do procedimento cirúrgico. Os animais receberam 2 doses de 3mg/kg de cetoprofeno IV a cada 24 horas, sendo a primeira antes da cirurgia.

Amostras de sangue da jugular externa foram colhidas para dosagem de cortisol em tubos sem anticoagulante e para realização de hemograma em tubos contendo EDTA. Estas amostras foram colhidas em diferentes momentos, sempre na mesma hora do dia, sendo eles: M1- sete dias antes do desafio (orquiectomia); M6- 1 dia após; M7- três dias após e M8- oito dias após o desafio.

No hemograma, o número total de leucócitos e de eritrócitos por microlitro foi mensurado por meio de analisador automático⁶ de hematologia e a diferenciação do padrão leucocitário foi feita em esfregaços sanguíneos analisados em microscópio óptico em objetiva de imersão de 100x. Para dosagem de cortisol, o soro sanguíneo foi separado por centrifugação (1500xg por 15 min) e congelado até a realização das análises, por meio da técnica de ELISA, usando o kit comercial (Enzo Life Science®, USA).

Para verificação da citologia do trato respiratório, foi realizado lavado broncoalveolar nos momentos M1, M6 e M8, respeitando-se o intervalo de sete dias entre os exames, período em que o procedimento de sondagem nasobronquial não interfere com a citologia broncoalveolar (Benesi et al. 2012). Os lavados foram colhidos pela técnica de broncoscopia por via nasal, inserindo-se o equipamento até os brônquios (caracterizando lavado broncoalveolar). Instilou-se 80 mL de solução fisiológica 0,9% a temperatura ambiente pelo canal de trabalho, aspirando-se posteriormente o material por aspirador cirúrgico, recuperando-se um volume entre 40 a 50 ml. No laboratório, as amostras foram submetidas a duas lavagens e centrifugações (1000xG por 15 minutos e 400x G por 10 minutos) sequenciais com PBS gelado, sendo o pellet de células resuspendido com 2ml do meio de cultivo RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Para a contagem total de células broncoalveolares, 10ul desta suspensão celular foi diluída em 90ul de azul de tripan, e as células vivas foram contadas em câmara de Neubauer, conforme técnica descrita por Weiss & Wardrop (2010) para contagem total de leucócitos. Para a análise citológica diferencial, 200 ul da suspensão celular foi utilizada para confecção de lâminas por meio de citocentrifugação (28xg por 6 minutos), procedendo-se a contagem diferencial em microscopia após coloração com corante Rosenfeld, classificando 400 células.

Para a análise estatística os dados foram submetidas ao teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e teste *F* de variância, ambos com nível de significância de $P < 0,05$. Por serem amostras normais, com variâncias iguais, optou-se pela utilização de teste paramétrico Análise de variância para amostras pareadas. Quando a significância entre as variáveis foi menor que 5%, comparou-se cada momento pelo teste de Tukey, com nível de significância de $P < 0,05$ e de tendência para $P < 0,10$ por meio do software Graphpad *Instat*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento, nenhum dos animais apresentou alterações nos exames físico, no leucograma ou broncoscópico que indicasse alguma enfermidade (Feitosa 2008). As variáveis do hemograma em função dos momentos encontram-se na Tabela 1 e Figura 1. Quando analisada as variáveis da série vermelha, encontrou-se redução significativa ($P < 0,05$) em todos os valores um dia após a cirurgia, exceto para os valores de índices hematimétricos que permaneceram dentro dos limites da normalidade (George et al, 2010) Na série branca (Figura 1) encontrou-se aumento

⁶ ABC Vet.® Marca ABX™ Horiba, Montpellier, France.

Quadro 1. Valores hematológicos de bezerros submetidos a desafio doloroso. São Paulo, 2013

Variáveis	Momentos			
	M1	M6	M7	M8
Hemáceas x10 ⁶ /ul				
Média	7,37a	6,59b	7,03ab	7,02ab
(desvio padrão)	(0,56)	(0,5)	(0,52)	(0,85)
Hemoglobina g/dl				
Média	9,48a	8,40b	8,91ab	8,91ab
(desvio padrão)	(1,12)	(0,94)	(1,38)	(1,45)
Volume globular %				
Média	27,95a	24,58b	25,63ab	26,10ab
(desvio padrão)	(2,04)	(2,86)	(2,97)	(3,27)
RDW				
Média	16,96a	17,38b	18,02b	17,22b
(desvio padrão)	(1,12)	(1,29)	(1,14)	(1,13)
Leucócitos x10 ³ /ul				
Média	8087,5a	8112,5ac	9712,5abc	10213b
(desvio padrão)	(1426,7)	(1620,6)	(2272,5)	(1804,30)
Cortisol				
Média	5348,75a	6506,79	5136,44a	7882,30a
(desvio padrão)	(4337,6)	(3117,1)	(2495,9)	(5002,1)
Porcentagem de aumento	1a (0)	1,89ab(1,42)	1,47a(1,23)	2,01b(0,92)

RDW = Red cell distribution width, M1= antes da orquiectomia e M6, M7 e M8 respectivamente = 1, 3 e 8 dias após a orquiectomia. Letras iguais na mesma linha representam ausência de diferença estatística $P < 0,05$.

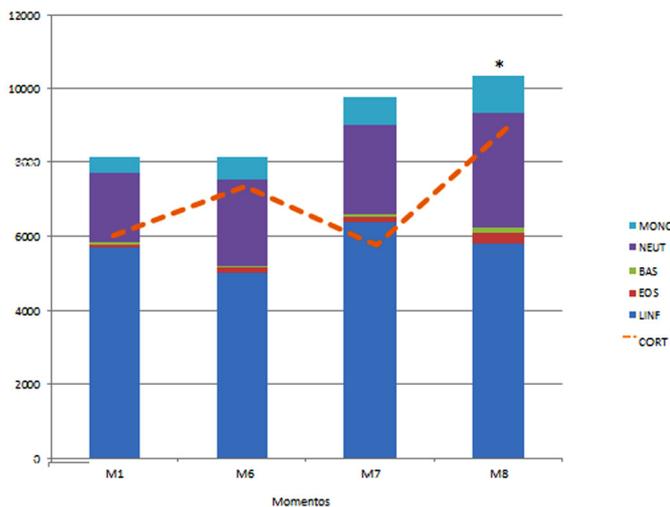


Fig.1. Valores leucocitários e do cortisol sérico de bezerros submetidos a desafio doloroso. São Paulo, 2013 (Mono = monócito, NEUT = neutrófilo, BAS = basófilos, Eos = eosinófilos, LINF = linfócitos, unidade para leucócitos x10³/uL, Cort = cortisol em pg/mL, M1 = antes da orquiectomia e M6, M7 e M8 = respectivamente 1, 3 e 8 dias após a orquiectomia. * Indica diferença estatística entre M1 e M8, onde $P < 0,05$ para as variáveis leucócitos e monócitos e tendência biológica para neutrófilos, $0,05 > P < 0,10$.)

estatístico dos valores de leucócitos ($P < 0,05$), por monócitos ($P < 0,05$) e com tendência a aumento de neutrófilos ($P = 0,09$) oito dias após a cirurgia (M8).

Os valores séricos do cortisol diferiram muito entre os animais. Quando analisados os valores médios, notou-se alto desvio padrão e ausência de diferença estatística entre os momentos. Ao calcular-se individualmente a variação do cortisol utilizando o momento zero como base, limitou-se a

variação individual e encontrou-se um aumento significativo de cortisol no M8 (Quadro1, Fig.1). Os trabalhos que estudaram os efeitos da orquiectomia com o mesmo protocolo analgésico, evidenciaram aumento de cortisol entre 8 a 12 horas após cirurgia, retornando aos teores basais em 24 horas após o procedimento. Infelizmente estes trabalhos limitaram a avaliação do cortisol em até 3 dias após a cirurgia (Ballou et al 2013, Early & Crowe 2002, Mellor et al. 2002, Ting et al. 2003), ocultando um aspecto importante, no qual o procedimento pode gerar um estresse crônico.

Como o cortisol é um hormônio indicador de estresse, (Fitzpatrick et al. 2006, Thuer et al. 2007), pode-se explicar que o desafio doloroso causou estresse responsável pelo aumento dos leucócitos e suas populações no M8, representativo de um leucograma típico de estresse, que é caracterizado por neutrofilia, acompanhado ou não por eosinofilia, monocitose, basofilia e linfopenia conforme as magnitudes do hormônio circulante (Buton et al. 2005, Weiss & Wardrop 2010). Tal fato ocorre principalmente porque corticoides tendem a inibir a quimiotaxia destas células, especialmente dos neutrófilos, para locais inflamados, além de diminuir a eficiência de fagocitose, causando um quadro de imunossupressão (Raida et al. 1997, Buton et al. 2005, Weiss & Wardrop 2010).

Tal qual a presente pesquisa, Ting et al. (2003) também encontraram leucograma de estresse mais tardio, sete dias após a orquiectomia, reforçando que o procedimento doloroso pode afetar os bovinos mais tardiamente do que têm sido estudado.

Os achados citológicos broncoalveolares encontrados nos bezerros constam no Quadro 2 e na Figura 2. O desafio doloroso não promoveu alteração significativa na porcentagem de células broncoalveolares. Porém observou-se uma diminuição de macrófagos e aumento de neutrófilos no M6 não significativa (Quadro 2, Fig.2). Três dos oito animais es-

Quadro 2. Contagem total e diferencial das células broncoalveolares de bezerros submetidos a desafio doloroso. São Paulo, 2013

Citologia	Momentos			
	M1	M6	M8	P
Macrófagos %				
Média	78,81a	65,38a	75,20a	0,17
(Desvio Padrão)	(11,38)	(23,24)	(18,51)	
Neutrófilos %				
Média	17,2a	28,93a	19,70a	0,28
(Desvio Padrão)	(12,37)	(24,29)	(18,37)	
Linfócitos %				
Média	3,62a	4,37a	4,16a	0,80
(Desvio Padrão)	(1,41)	(3,73)	(2,76)	
Eosinófilos %				
Média	0,12a	0,27a	0,68a	0,46
(Desvio Padrão)	(0,35)	(0,59)	(1,25)	
Cél epitelia %				
Média	0,22a	1,04a	0,2a	0,33
(Desvio Padrão)	(0,52)	(1,94)	(0,39)	
Total células x10 ⁶ / mL				
Média	1,29a	4,92b	1,68a	0,003
(Desvio Padrão)	(0,52)	(2,14)	(0,80)	

M1 = antes da orquiectomia e M6, M7 e M8 = respectivamente 1, 3 e 8 dias após a orquiectomia. Letras iguais na mesma linha representam ausência de diferença estatística $P < 0,05$.

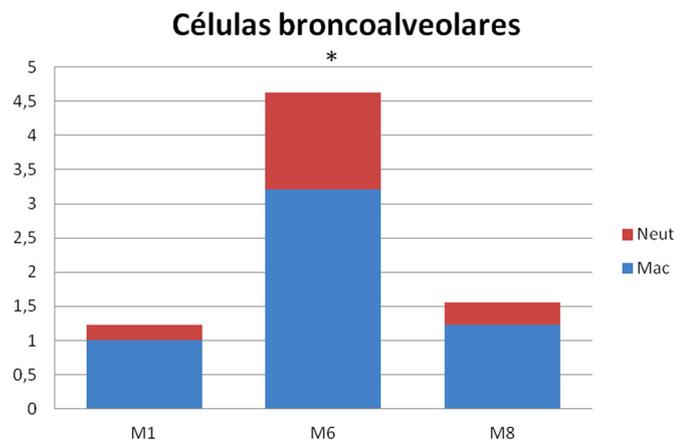


Fig.2. Valores das principais células broncoalveolares encontradas em bezerros submetidos a desafio doloroso. São Paulo, 2013 (Mac = macrófagos alveolares, NEUT = neutrófilo, unidade: $\times 10^6/\text{mL}$ M1 = antes da orquiectomia e M6 e M8 = respectivamente 1 e 8 dias após a orquiectomia. * Indica diferença estatística entre m1 e m8 $p > 0,05$ para as variáveis leucócitos e monócitos e tendência biológica para neutrófilos $0,05 < p < 0,10$.)

tudados demonstraram notoriamente um predomínio neutrofilico enquanto outros mantiveram o perfil macrofágico em todos os momentos (Fig.3). Provavelmente isso ocorreu porque os animais vivenciaram o estresse diferentemente um dos outros (Broom & Molento 2004, Broom 2005, Grandin 2010), caracterizando que o limiar de estresse pode ser diferente para cada animal, tal como é observado em humanos (Kunz-Ebrecht et al. 2003)

Ao estudar os números absolutos dos leucócitos broncoalveolares, observou-se um influxo celular significativo para a região um dia após o desafio, com aumento significativo principalmente de macrófagos alveolares e neutrófilos (Fig.2).

Chiu et al. (2012) relaram que neurônios nociceptores possuem os mesmos receptores que reconhecem padrões

moleculares de perigo (DAMPs- damage associated molecular patterns) que as células imune. Durante a injúria tecidual são liberados produtos como ATP e ácido úrico que ativam ao mesmo tempo, a transmissão de dor e as células imune a produzirem citocinas inflamatórias, particularmente as interleucinas 1 e 6, aumentando a inflamação local, com a finalidade de montar uma resposta imune capaz de debelar o agente irritante. No entanto, uma inflamação muito exacerbada se torna danosa ao paciente, por isso conforme se intensifica a inflamação, o excesso de produtos resultantes da injúria tecidual aumenta o estímulo doloroso e sua transmissão, que ao atingir um limiar, inibe a produção das citocinas inflamatórias, minimizando a resposta imune.

Se este fato ocorreu no presente trabalho, pode-se esperar que a partir do M6, houve uma diminuição da atividade celular, situação já relatada para neutrófilos sanguíneos de bezerros 24 horas após orquiectomia com protocolo analgésico (Ballou et al. 2013), mas não estudado em células do trato respiratório. Se realmente houve uma menor efetividade também das células broncoalveolares, é esperado que as células residentes mobilizem outras células do sangue para manter o trato respiratório hígido, justificando o aumento da celularidade, de neutrófilos e de macrófagos no trato respiratório no M6.

Oito dias após o desafio doloroso (M8), evidenciou-se um aumento significativo de cortisol, que pode interferir tanto na citologia e função celular do trato respiratório (Raidal et al. 1997, Ishizaki et al. 2005, Bertagnon et al. 2011), como também na diminuição de quimiotaxia leucocitária (Buton et al. 2005, Weiss & Wardrop 2010). Assim, pode-se dizer que as células broncoalveolares continuaram com suas funções diminuídas e a defesa local não foi compensada pela mobilização de mais células para o local, sugerindo um aumento de susceptibilidade a afecções respiratórias neste período mais tardio, como já anteriormente notado por Snowden et al. (2006).

Levando-se em consideração que a redução a atividade

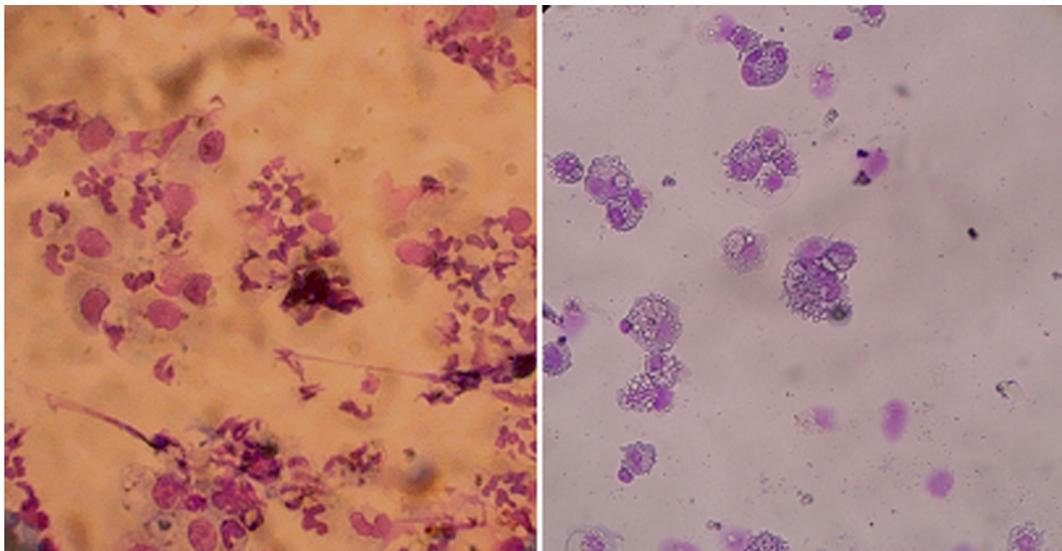


Fig.3. Citologia broncoalveolar de bezerros no M6 em aumento de 400x. (A) Predomínio de células neutrofilicas e alguns macrófagos alveolares, (B) Predomínio de células macrofágicas.

imune tenha começado no M6, poder-se-ia sugerir que a diminuição significativa de valores eritrocitários (hemácias, hemoglobina e volume globular), no dia seguinte a orquiectomia (M6), seja referente a doenças como tristeza parasitária bovina, afecções comuns após eventos de dor e ou estresse (Broom & Molento 2004, Broom 2005, Grandin 2010). Procedimentos cirúrgicos também causam perdas sanguíneas levando a anemia (Ting et al. 2003), no entanto, os sangramentos durante o procedimento visualmente foram de baixa intensidade, sugerindo que não foram os únicos responsáveis pela alteração hematológica da série vermelha.

Os animais estavam hígidos no início do experimento, verificado pelo exame físico, broncoscópico e hemograma (Feitosa 2008). Observou-se que os resultados hematológicos não indicavam anemia, não observando-se presença de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos como também não foram encontrados indícios de eritrorregeneração nos esfregaços, como ponteados basófilo ou anisocitose moderada além dos valores de RDW (*Red Cell Distribution Width*- largura de distribuição dos eritrócitos) estarem baixos. RDW é uma medida entre a variação do tamanho das hemácias e seu aumento indica o aumento da eritropoiese após episódios de hemólise ou deficiência de ferro (Weiss & Wardrop 2010) o que não estava ocorrendo neste momento. Um dia após a orquiectomia, evidenciou-se anemia leve normocítica e normocrômica e presença de anaplasiose leve a moderada, conforme critérios estabelecidos por Weiss & Wardrop (2010). Apesar destes achados, os animais não apresentaram outras manifestações clínicas condizentes com a enfermidade, como pirexia, apatia ou mucosas esbranquiçadas (Jonsson et al. 2012).

Quando o bovino se infecta com *Anaplasma* sp., ele permanece persistentemente infectado como portador por longos períodos, embora não seja possível detectar o parasita em esfregaços sanguíneos nesta fase, somente na fase aguda da doença (Aubry & Geale 2011). Portanto é possível que no início do experimento os animais já eram portadores de *Anaplasma* sp, não detectada em esfregaços sanguíneos, mas que após o procedimento, houve uma multiplicação do agente, evoluindo para fase aguda da doença (Aubry & Geale 2011), resultando em hemólise, causada tanto pelo parasita como pelo sistema imunológico (Kieser et al. 1990, Jonsson et al. 2012). Apesar da doença manifestar febre e anemia mais intensa (Jonsson et al. 2012), o fato dos animais terem sido tratados com anti-inflamatório não esteroideal (cetoprofeno) pode ter diminuído a ação do sistema imune nas hemólises (Kieser et al. 1990), resultando em anemia de pequeno grau, justificando o não tratamento da afecção. No M7 e M8, observou-se sinais de regeneração, visto pelo aumento de RDW e aumento dos valores de hemácias, volumes globulares e hemoglobina indicando uma melhora na fase aguda da afecção.

CONCLUSÃO

O processo doloroso, mesmo acompanhado de protocolo analgésico, pode ser considerado um fator de risco a pneumonias, pois a mobilização celular de neutrófilos para o

trato respiratório hígido um dia após o procedimento seguida pela diminuição neutrofilica no local concomitante ao aumento sérico de cortisol uma semana após o procedimento, sugerem redução da resposta imune pulmonar e sistêmica

Agradecimentos.- Apoio financeiro FAPESP, projeto 2011/21632-0.

REFERÊNCIAS

- Ackermann M.R., Derscheid R. & Roth J.A. 2010. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet. Clin. Food Anim.* 26:215-228.
- Anderson N. 2007. Castration of calves. *Factsheet Anim. Sci.* 29(7):420-426.
- Aubry P. & Geale D.W. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg. Dis.* 58(1):1-30.
- Ballou M.A., Sutherland M.A., Brooks T.A., Hulbert L.E., Davis B.L. & Cobb C.J. 2013. Administration of anesthetic and analgesic prevent the suppression of many leukocyte responses following surgical castration and physical dehorning. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:285-293.
- Benesi B., Wachholz L., Bertagnon H.G., Leal M.L.R., Mori E. & Fernandes W.R. 2012. Citologia dos lavados traqueobrônquico (LTB) e broncoalveolar (LBA) de bezerros holandeses sadios durante o primeiro mês de vida. *Pesq. Vet. Bras.* 32(3):267-270.
- Bertagnon H.G., Esper G.V.Z., Emanuelli M.P. & Pellegrine L.G. 2011. Influência meteorológica no leucograma e na população citológica do trato respiratório de bezerros. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):244-246.
- Broom D.M. & Molento C.F.M. 2004. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas: uma revisão. *Archs Vet. Sci.* 9(2):1-11.
- Broom D.M. 2005. Animal Welfare Education: development and prospects. *J. Vet. Med. Educ.* 32(4):438-441.
- Burton J.L., Madsen A.S., Chang L.C., Weber P.S.D., Buckham K.R., Dorp R., Hickey M.C. & Earley B. 2005. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105:197-219.
- Chiu I.M., Vom Hehn C.A. & Woolf C.J. 2012. Neurogenic inflammation and peripheral nervous system in host defence and immunopathology. *Nat. Neurosci.* 15(8):1063-1067.
- Earley B. & Crowe M.A. 2002. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses. *J. Anim. Sci.* 80:1044-1052.
- Fantoni D.T. & Mastrocinque S. 2002. Fisiopatologia da dor, p.323-334. In: Fantoni D.T. & Cortopassi S.R.G. (Eds), *Anestesia em Cães e Gatos*. Roca, São Paulo.
- Feitosa F.L.F. 2008. *Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico*. 2ª ed, Roca, São Paulo. 735p.
- Fitzpatrick J., Scott M. & Nolan A. 2006. Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Rum. Res.* 62:55-61.
- George J.W., Snipes J. & Michael Lane V. 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet. Clin. Pathol.* 39(2):138-148.
- Gonçalves R.C., Lisbôa J.A.N., Sousa M.V., Almeida C.T., Kuchembuck M.R.G. & Chiacchio S.B. 2000. Aspectos clínicos e epidemiológicos da broncopneumonia dos bezerros em Botucatu, SP. *Revta Bras. Sci. Vet.* 7:144-147.
- Grandin T. 2010. *Improving Animal Welfare: a practical approach*. CABI, Cambridge, UK. 328p.
- Ishizaki H., Hanafusa Y. & Kariya Y. 2005. Influence of truck transportation on the function of bronchoalveolar lavage fluid cells in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105:67-74.
- Jonsson N.N., Bock R.E., Jorgensen W.K., Morton J.M. & Stear M.J. 2012. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept? *Trends Parasitol.* 28:85-89.

- Kieser S.T., Eriks I.S. & Palmer G.H. 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.* 58:117-119.
- Kunz-Ebrecht S.R., Mohamed-Ali A., Feldman P.J., Kirschbaum C. & Steptoe A. 2003. Cortisol response to mild psychological stress are inversely associated with proinflammatory cytokines. *Brain Behav. Immun.* 17:373-383.
- Mellor D.J., Stafford K.J., Todd S.E., Lowe T.E., Gregory N.G., Bruce R.A. & Ward R.N. 2002. A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust. Vet. J.* 80(4):228-233.
- Paranhos da Costa M.J.R. & Cromberg V.U. 1997. Alguns aspectos a serem considerados para melhorar o bem-estar de animais em sistema de pastejo rotacionado, p.273-296. In: Peixoto A.M., Moura J.C. & Faria V.C. (Eds), *Fundamentos do Pastejo Rotacionado*. FEALQ, Piracicaba.
- Raidal S.L., Baily G.D. & Love D.N. 1997. Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophil function. *Aust. Vet. J.* 75:433-438.
- Snowder G.D., Van Vleck L.D., Cundiff L.V. & Bennett G.L. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J. Anim. Sci.* 84:1999-2008.
- Ting S.T.L., Earley B. & Crowe M.A. 2003. Effect of repeated ketoprofen administration during surgical castration of bulls on cortisol, immunological function, feed intake, growth, and behavior. *J. Anim. Sci.* 81:1253-1264.
- Thüer S., Mellema S., Doherr M.G., Wechsler B., Nuss, K. & Steiner A. 2007. Effect of local anesthetic on short- and long-term pain induced by two bloodless castration methods in calves. *Vet. J.* 173:333-342.
- Weiss D.J. & Wardrop K.J. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Wiley and Blackwell, Iowa. 1232p.