

Imunoglobulinas no trato respiratório de bezerros saudáveis durante o primeiro mês de vida¹

Heloisa G. Bertagnon², Paulo E.G. da Silva², Lucia Wachholz², Marta L.R. Leal², Wilson R. Fernandes³ e Fernando J. Benesi^{3*}

ABSTRACT.- Bertagnon H.G., Da Silva P.E.G., Wachholz L., Leal M.L.R., Fernandes W.R. & Benesi F.J. 2007. [Immunoglobulin in the respiratory tract of healthy calves during their first month of life.] *Imunoglobulinas no trato respiratório de bezerros saudáveis durante o primeiro mês de vida. Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(12):487-490. 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: febenci@usp.br

The immunoglobulin variation profile in lavages from the bronchoalveolar and tracheo-bronchial regions of 20 healthy newborn Holstein male calves was studied. They were fed with colostrum and distributed into 2 groups, 10 animals each. Group 1 underwent the nasotracheal catheterization technique to get the bronchoalveolar lavage (BAL), and Group 2 underwent the tracheocentesis to collect the tracheobronchial lavage (TBL), both procedures being carried out at a 7-day-interval, starting on the first days up to about one month of life. Higher IgG contents, as compared to IgA, were noted across the respiratory tract. These immunoglobulins were impacted by the site of the respiratory tract washed, as well as by the calves' life time in weeks. Higher immunoglobulin contents were detected in TBL, as well as higher IgM and IgA rates, as compared to BAL. The BAL immunoglobulins showed a tendency to be reduced in TBL.

INDEX TERMS: Immunoglobulin, respiratory tract, calves.

RESUMO.- Estudou-se o perfil de variação das imunoglobulinas em lavados das regiões traqueobrônquica e broncoalveolar do trato respiratório de bezerros neonatos saudáveis. Vinte bezerros da raça Holandesa, recém-nascidos e clinicamente saudáveis, receberam o colostro e foram distribuídos em dois grupos de dez animais cada. O Grupo 1 foi submetido à técnica de sondagem nasotraqueal para obtenção de lavado broncoalveolar (LBA) e o Grupo 2, à traqueocentese para colheita de lavado traqueobrônquico (LTB), sendo estes procedimentos realizados em intervalos semanais, iniciando-se nos primeiros dias pós-nascimento até, aproximadamente, um mês de vida. Verificaram-se maiores teores de IgG que IgA ao longo

do trato respiratório e estas imunoglobulinas sofreram influências da região do trato respiratório lavado, bem como influência do tempo de vida dos bezerros. Pôde-se detectar maiores teores de imunoglobulinas no LTB, assim como as maiores taxas de IgM e IgA em comparação com aquelas do LBA. As imunoglobulinas do LBA tenderam a aumentar seus teores com a evolução das semanas de vida dos bezerros, enquanto tenderam a diminuir no LTB.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Imunoglobulinas, lavado pulmonar, traqueocentese, sondagem nasotraqueal, bezerros.

INTRODUÇÃO

A avaliação das secreções do trato respiratório é um exame complementar importante para a elucidação do estado funcional respiratório, uma vez que animais aparentemente saudáveis ao exame com métodos semiológicos tradicionais podem apresentar alterações nas vias respiratórias posteriores (Koterba 1993, Stöber 1993, Gonçalves 1997). Assim, os lavados do trato respiratório têm sido utilizados com esta finalidade em grandes animais. Os lavados traqueobrônquico e/ou broncoalveolar são obtidos por diversas técnicas que podem

¹ Recebido em 25 de junho de 2007.

Aceito para publicação em 26 de Novembro de 2007.

Projeto Financiado pela FAPESP, Auxílio Pesquisa 00/06784-3.

² Pós-graduandos do Programa de Clínica Veterinária, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

³ Departamento de Clínica Médica, FMVZ, USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. *Autor para correspondência: febenci@usp.br

interferir nos seus achados, pois na dependência da região respiratória lavada e ambiente onde são mantidos os animais, tem sido encontradas diferenças nas populações celulares e microbiológicas constatadas, e nos teores de imunoglobulinas mensurados (Anderson et al. 1986, Pringle et al. 1988, Gonçalves et al. 1990, Allen et al. 1991, Barros et al. 1994).

Com o intuito de gerar conhecimentos para uma melhor compreensão da fisiologia e defesas do sistema respiratório de neonatos bovinos, para a fundamentação de diagnóstico das enfermidades respiratórias, assim como para contribuir com a rara literatura nacional sobre o assunto, o trabalho propõe a realização de avaliações de lavados respiratórios de bezerros neonatos no decorrer do primeiro mês de vida por meio do estudo e estabelecimento de padrões quantitativos e qualitativos de variações dos teores de imunoglobulinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 20 bezerros, da raça Holandesa Preta e Branco, clinicamente saudáveis, com um a seis dias de vida, que consumiram colostro, provenientes de propriedades criatórias do interior de São Paulo. Durante o estudo os animais foram instalados no Setor Experimental da Clínica de Bovinos do Departamento de Clínica Médica, FMVZ/USP, em gaiolas individuais, sendo alimentados com quatro litros de sucedâneo de leite, aquecido a 37°C, em mamadeiras, fracionados em duas mamadas diárias. Somente os animais hígidos foram utilizados na pesquisa, sendo a higidez verificada através de exames físicos diários, bem como por exames laboratoriais semanais (hemograma, bioquímica sérica e hemogasometria arterial).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, cada um com dez bezerros, agrupados de acordo com a técnica utilizada para a colheita do lavado respiratório, sendo no Grupo 1 (G1), realizada a colheita do lavado broncoalveolar (LBA) pela técnica de sondagem nasotraqueal, e no Grupo 2 (G2), realizada a obtenção do lavado traqueobrônquico (LTB) por meio de traqueocentese. A primeira colheita foi efetuada em bezerros com 5 a 7 dias de vida e a seguir, semanalmente até completarem aproximadamente um mês de vida, totalizando quatro colheitas.

As avaliações do hemograma foram realizadas segundo técnicas e padronização descritas por Birgel (1982). As análises dos gases sanguíneos e determinações do equilíbrio ácido-básico, foram processadas em analisador automático de pH e gases sanguíneos (Hemogásometro ABL 330 e ABL 5-Radiometer, Copenhagen), em até 2 horas após a colheita do sangue arterial por punção da artéria safena (Wachholz et al. 2002).

As quantificações das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) no soro sanguíneo e nos lavados respiratórios, foram efetuadas por meio da técnica de imunodifusão radial simples, utilizando conjuntos comerciais de IgG, IgM e IgA para bovinos (VMRD Inc., procedência americana).

As dosagens dos constituintes bioquímicos dos lavados respiratórios foram realizadas após processo de concentração dos mesmos, utilizando-se para essa finalidade sistema de concentração por filtração (Sistema Ultrafree Biomax 5K- Milipor), com poder de retenção de moléculas de peso molecular superior a 5000 Daltons. Deste modo, a correção dos valores das imunoglobulinas obtidos nos lavados foi efetuada utilizando a fórmula proposta por Fernandes (2001), levando-se em consideração os teores da uréia sanguínea e dos lavados, e da proteína dos lavados respiratórios:

$$VR = VE \times (US/UL) \times (PAC/PDC)$$

Sendo: VR = Valor Real das imunoglobulinas do lavado; VE = Valor

Encontrado para as imunoglobulinas no lavado; US = teor de Uréia no Soro sanguíneo; UL = teor de Uréia no lavado; PAC = teor de Proteína no lavado Antes da Concentração por filtração e PDC = teor de Proteína no lavado Depois da Concentração por filtração.

A análise estatística dos teores de todos os componentes do soro sanguíneo e dos lavados respiratórios foi realizada utilizando-se o programa estatístico computadorizado MINITAB (1998). Para cada técnica (G1 e G2) e em cada semana de colheita (1ª, 2ª, 3ª e 4ª), foram calculadas, como medida de tendência central, as medianas e percentis das diferentes classes de imunoglobulinas dos lavados do trato respiratório e do soro sanguíneo de bezerros neonatos. Em cada técnica foram comparadas entre si, os teores de imunoglobulinas obtidos nas quatro semanas utilizando-se a prova não paramétrica de Friedman e de Mann-Whitney (Zar 1984). Semanalmente, realizou-se a comparação dos resultados obtidos com o uso das duas técnicas de colheita dos lavados, por meio da prova de Levene (Zar 1984). Foram consideradas diferenças significativas quando *p* apresentou valores inferiores ou iguais a 0,05 (Sampaio 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de imunoglobulinas séricas encontrados (Quadro 1) são compatíveis com os de animais que mamaram quantidades adequadas de colostro, estando de acordo com os achados obtidos por Wittum & Perino (1995). Nos dois grupos, as variações das diferentes classes de imunoglobulinas, foram semelhantes, tendendo a diminuir com o passar do tempo, refletindo fisiologicamente o comportamento sérico característico da fase neonatal, conforme relatado por Radostits et al. (2000).

Quando comparadas as duas técnicas de colheita de lavado (Quadro 2), notou-se que os teores de imunoglobulinas foram menores no LBA que no LBT, significativamente na segunda semana de vida dos bezerros; havendo tendência a aumentar estes valores no LBA e a diminuir no LTB com a evolução das semanas de vida, evidenciando-se teores semelhantes destes componentes nos dois locais de lavado na última semana de colheita destes animais.

Quadro 1. Valores das medianas das taxas de imunoglobulinas séricas de bezerros holandeses de acordo com os grupos submetidos às técnicas de sondagem nasotraqueal para obtenção do LBA (Grupo 1) e de traqueocentese para obtenção de LTB (Grupo 2), segundo as semanas durante o primeiro mês de vida dos animais

Grupos		Concentração de imunoglobulinas séricas (mg/dl)			
		Tempo (semanas)			
		1	2	3	4
Grupo 1	IgG	3530,00 ^{aA}	3355,36 ^{aA}	2230,24 ^{aA}	2230,24 ^{aA}
	IgM	90,37 ^{aA}	77,48 ^{aA}	65,02 ^{aA}	72,78 ^{aA}
	IgA	22,72 ^{aA}	22,72 ^{aA}	25,82 ^{aA}	40,59 ^{aA}
Grupo 2	IgG	2774,74 ^{aA}	2421,15 ^{aA}	2035,33 ^{aA}	2166,42 ^{aA}
	IgM	90,37 ^{aA}	74,02 ^{aA}	79,78 ^{aA}	93,90 ^{aA}
	IgA	44,45 ^{aA}	40,59 ^{aA}	35,23 ^{aA}	44,45 ^{aA}

^a Medianas com letras minúsculas coincidentes em mesma linha, indicam ausência de diferença estatística entre as semanas dentro de cada técnica (grupo) (*p* > 0,05).

^A Medianas com letras maiúsculas coincidentes em mesma coluna, indicam ausência de diferença estatística entre os grupos dentro de cada semana (*p* > 0,05).

Quadro 2. Valores das medianas das taxas de imunoglobulinas nos lavados do trato respiratório de bezerros obtidos pelas técnicas de sondagem nasotraqueal para colheita de LBA (Grupo 1) e de traqueocentese para obtenção de LTB (Grupo 2), segundo as semanas durante o primeiro mês de vida dos animais

Grupos		Concentração de imunoglobulinas no lavado do trato respiratório (mg/dl)			
		Tempo (semanas)			
		1	2	3	4
Grupo 1	IgG	161,49 ^{aA}	105,35 ^{aA}	152,87 ^{aA}	270,75 ^{aA}
	IgM	9,22 ^{aA}	4,10 ^{aA}	9,89 ^{aA}	16,89 ^{aA}
	IgA	2,54 ^{aA}	1,44 ^{aA}	1,49 ^{aA}	3,12 ^{aA}
Grupo 2	IgG	266,94 ^{aA}	300,55 ^{aB}	228,02 ^{aA}	222,37 ^{aA}
	IgM	36,83 ^{aA}	46,98 ^{aB}	43,86 ^{aA}	35,46 ^{aA}
	IgA	11,74 ^{aA}	7,96 ^{aB}	5,88 ^{aB}	3,62 ^{aA}

^a Medianas com letras minúsculas coincidentes em mesma linha, indicam ausência de diferença estatística entre as semanas dentro de cada técnica (grupo) ($p > 0,05$).

^{A,B} Medianas com letras maiúsculas não coincidentes em mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada semana ($p < 0,05$).

Diferenças nas taxas dos constituintes do lavado do trato respiratório, conforme o local de lavagem, também foram relatadas por outros pesquisadores em várias espécies animais (Liggitt 1985, Anderson et al. 1986, Mair et al. 1987, Pringle et al. 1988, Barros et al. 1994, Fernandes et al. 2000, Wachholz 2002). Neste estudo o LTB apresentou maiores teores de imunoglobulinas que o LBA. Possivelmente estas maiores taxas no LTB são determinadas após o nascimento dos bezerros, uma vez que o líquido pulmonar fetal não tem, praticamente, proteína em sua composição para proteger o trato respiratório durante a vida fetal (Bland 1998, Segre 2002). Assim, pode-se supor que ao longo de todo o trato respiratório há a mesma distribuição qualitativa e quantitativa de imunoglobulinas durante a vida fetal. Após o nascimento, inicia-se a deposição de partículas aerolizadas inaladas não filtradas pelo trato respiratório anterior, sendo a região traqueobrônquica destacada como possuidora de uma grande população de agentes bacterianos em comparação a região broncoalveolar (Wachholz 2002). A falta de proteção nos primeiros dias de vida favorece portanto maior estimulação de secreção ativa de imunoglobulinas nesta região na vida pós-natal (Hecket et al. 1991a,b).

O ajuste para a quantificação das imunoglobulinas, nesta pesquisa, foi realizado utilizando a fórmula proposta por Fernandes (2001), com o objetivo de corrigir as distorções nos resultados, provocadas pelas imprecisões e dificuldades das técnicas de colheita dos lavados. Esta fórmula leva em consideração os teores de uréia e de proteína total no sangue e no lavado, com a finalidade de assim mostrar o valor real das imunoglobulinas encontradas nos diferentes segmentos do trato respiratório. A uréia devido a seu baixo peso molecular e ser considerada substância que tem distribuição homogênea por todos os fluidos corpóreos, foi usada para corrigir a diluição do lavado. Já a proteína total, por não ter sido perdida durante o processo de concentração por filtração das amostras de LTB e LBA, nos dá a idéia exata da eficiência

do método de concentração e permite a sua correção (Rennard et al. 1986, Fernandes 2001).

Infelizmente poucos são os trabalhos que quantificaram imunoglobulinas em lavados respiratórios de bezerros sadios e dentre estes, nenhum utilizou o mesmo fator de ajuste usado na presente pesquisa, não sendo possível comparar as quantificações corrigidas e próximas das reais obtidas, com os resultados apresentados na literatura (Wilkie & Markhman 1981, Pringle et al. 1988). Wilkie & Markhman (1981) e Pringle et al. (1988) verificaram grande variação individual nas concentrações das diferentes classes de imunoglobulinas no trato respiratório, o que também ocorreu nesta pesquisa, explicando provavelmente a não comprovação de diferença estatística entre os locais de origem dos lavados na primeira, terceira e quarta semana de vida dos animais e tendências à diminuição ou ao aumento das imunoglobulinas nos diferentes locais de lavado em função do tempo.

O comportamento de variação das imunoglobulinas do LTB ao longo das semanas de vida dos bezerros foi divergente daquele encontrado no LBA, apesar dos animais terem sido mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo, estando teoricamente também expostos aos mesmos agentes microbianos. No LBA, a dinâmica de variação das três classes de imunoglobulinas se comportou de forma semelhante ao longo das semanas de vida, apresentando tendência à diminuição na segunda e/ou terceira semana, e posteriormente um aumento até a/ou na quarta semana de vida. O aumento destas imunoglobulinas com a evolução da idade já fora relatado em bezerros e gatos, sendo atribuído a um maior contato destes animais com agentes microbianos, levando a produção local de imunoglobulinas ou a lesões na parede subepitelial do trato respiratório com extravasamento provável de constituintes séricos para o lúmen pulmonar (Pringle et al. 1988, Mccarthy & Quinn 1991). Como o comportamento dos níveis séricos da IgG e IgM apresentaram um padrão diferente daquele do LBA no decorrer das semanas, provavelmente ocorreu, na presente pesquisa, uma produção local destas imunoglobulinas na região broncoalveolar, por maior estimulação microbiana da região.

No LTB, as dinâmicas de variação das taxas de IgG e IgM foram similares ao longo das semanas do estudo, apresentando tendência de aumento na segunda semana seguida por diminuição até a quarta semana, enquanto a IgA apresentou-se com progressiva redução até o final da observação. O comportamento de variação dos teores no soro e nos lavados apresentou-se similar, indicando uma não estimulação ativa de produção de imunoglobulinas nesta região, pois já havia altos teores de imunoglobulinas neste local na primeira e segunda semana de vida dos bezerros, sendo estes teores suficientes para proteção da região traqueobrônquica contra microorganismos, o que diferiu da dinâmica ocorrida na região broncoalveolar (Hecket et al. 1991a,b).

CONCLUSÕES

Com a presente pesquisa pôde-se concluir que o trato respiratório de bezerros sadios, com até um mês de vida e que mamaram colostro, apresenta maiores teores de IgG que IgA,

tanto na região traqueobrônquica quanto na região broncoalveolar. Os locais de origem do lavado respiratório influenciam as concentrações destas imunoglobulinas, havendo maiores teores na região traqueobrônquica, com maiores magnitudes das classes IgM e IgA em comparação àqueles da região broncoalveolar. Há também influência da evolução do tempo de vida dos bezerros sobre as taxas das imunoglobulinas, com tendências de aumento dos teores no LBA e de diminuição no LTb, em decorrência provável do contato das diferentes regiões respiratórias com microorganismos e produção ativa de imunoglobulinas nos bezerros saudáveis, particularmente na região broncoalveolar para garantir a defesa imunológica, impedindo a deflagração da doença.

Agradecimentos. - À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (Proc.01/09831-5).

REFERÊNCIAS

- Allen J.W., Vile L., Bateman K.G., Rosendal S., Shiewen P. & Physick-Sheard P. 1991. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage culture. *Can. J. Vet. Res.* 55:341-346.
- Anderson D.B., Moore P.F., Hyde D.M. & Dungworth D.L. 1986. Immunoglobulin containing cells in the tracheobronchial tree of cattle: relationship to age. *Res. Vet. Sci.* 41:221-227.
- Barros M.S.R.M., Castro R.S., Tabosa J.H.C., Brito M.F. & Amaral B. 1994. Colheita do fluido brônquico-alveolar de bezerros através da traqueocentese transcutânea. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 46:41-49.
- Benesi F.J., Wachholz L., Bertagnon, H.G. & Fernandes W.R. 2002. Obtenção do lavado traqueobrônquico pelos métodos de traqueocentese e sondagem naso-traqueal em bezerros neonatos. *Anais 29º Congr. Bras. Med. Vet., Gramado, Rio Grande do Sul.*
- Birgel E.H. 1982. Hematologia clínica veterinária, p.2-34. In: Birgel E.H. & Benesi F.J. (ed.), *Patologia Clínica Veterinária*. 2ª ed. Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo. 260p.
- Bland R.D. 1998. Formation of fetal lung liquid and its removal near birth, p.1047-1054. In: Ox W.W. (ed.), *Fetal and New Natal Physiology*. 2ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Fernandes R.W. 2001. Estudo clínico e da dinâmica de imunoglobulinas séricas e no lavado bronco-alveolar de equinos experimentalmente infectados com herpesvírus equino tipo 1. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo. 92p.
- Fernandes R.W., Mori E. & Sanches A. 2000. Avaliação citológica dos lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente saudáveis utilizando-se o método de coloração de Rosenfeld. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52:604-609.
- Gonçalves R.C. 1997. Estudo clínico e citológico em bezerros clinicamente saudáveis e portadores de broncopneumonia moderada e grave: o lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP. 144p.
- Gonçalves R.C., Kuchembuck M.R.G. & Almeida C.T. 1990. Lavagem traqueobrônquica por traqueocentese em bovinos. *Revta Fac. Vet. Zootec., Unesp*, 2:17-25.
- Hecker R.A., Saif L.J., Mengel J.P. & Myers G.W. 1991a. Isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in serum, feces, and mucosal secretions from experimentally challenge-exposed colostrum-deprived calves. *Am. J. Vet. Res.* 52:692-699.
- Hecker R.A., Saif L.J., Mengel J.P. & Myers G.W. 1991b. Mucosal and systemic antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in experimentally challenge-exposed calves fed low or high amounts of colostrum antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 52:700-708.
- Koterba A.M. 1993. Identificação do neonato de alto risco. Distúrbios e tratamento do neonato, p.299-301. In: Smith B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. Vol.1. Editora Manole, São Paulo.
- Liggitt H.D. 1985. Defense mechanism in the bovine lung. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 1:347-366.
- Mair T.S., Stokes C.R. & Bourne F.J. 1987. Quantification of immunoglobulin in respiratory secretions of the horse. *Vet. Immun. Immunopath.* 14:197-203.
- McCarthy M.G. & Quinn P.J. 1991. Age-related changes in protein concentrations in serum and respiratory tract lavage fluid obtained from cats. *Am. J. Vet. Res.* 52:254-260.
- Minitab 1998. *The Student Edition of Minitab Statistical Software Adapted for Education - 12,1 Release - User's Manual*. Addison-Wesley, New York. 624p.
- Pringle J.K., Viel L., Shewen P.E., Willoughby R.A., Martin S.W. & Valli V.E.O. 1988. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: Cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. *Can. J. Vet. Res.* 52:248.
- Rabelo S.S.A., Lima Junior A.D., Castro R.S. & Tabosa J.H.C. 1996. Sazonalidade da broncopneumonia em bezerros da microrregião de Garanhuns, Pernambuco (1983-1991). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48:19-26.
- Radostis O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.
- Rennard S.I., Basset G., Lecossier D., O'donnell M., Pinkston P., Martin P.G. & Crystal R.G. 1986. Estimation of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as a marker of dilution. *J. Appl. Physiol.* 60:532-538.
- Sampaio I.B.M. 1998. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Departamento de Zootecnia, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMG. 221p.
- Segre C.A.M. 2002. Taquipnéia transitória do RN, p.504-506. In: Segre C.A.M. (ed.), *Perinatologia: fundamentos e prática*. Sarvier, São Paulo.
- Stöber M. 1993. Aparelho respiratório, p.139-165. In: Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. (ed.), *Exame Clínico dos Bovinos*. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Wachholz L. 2002. Citologia dos lavados traqueobrônquico (LTb) e broncoalveolar (LBA) de bezerros holandeses sem alterações respiratórias, no primeiro mês de vida. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo. 106p.
- Wachholz L., Bertagnon H.G. & Benesi F.J. 2002. Técnica de colheita de sangue arterial em bezerros neonatos utilizando-se a artéria safena. *Anais 1º Congr. Bras. Especialidades em Medicina Veterinária, Curitiba, Paraná*, p.3.
- Wilkie B.N. & Markham J.F. 1981. Bronchoalveolar washing cells and immunoglobulins of clinically normal calves. *Am. J. Vet. Res.* 42:241-243.
- Wittun T.E. & Perino L.J. 1995. Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. *Am. J. Vet. Res.* 56:1149-1154.
- Zar J.H. 1984. *Bioestatistical Analysis*. 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 450p.