

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

BEATRYZ FONSECA DA SILVA

Avaliação dos efeitos da indução da resposta inflamatória aguda em modelos experimentais  
bovinos desafiados com LPS endovenoso e vacinação

Uberlândia

2024

BEATRYZ FONSECA DA SILVA

Avaliação dos efeitos da indução da resposta inflamatória aguda em modelos experimentais  
bovinos desafiados com LPS endovenoso e vacinação

Trabalho de Conclusão de Tese apresentado à  
Faculdade de Medicina Veterinária da  
Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
doutor em Ciências Veterinária

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

Uberlândia

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2024	<p>Silva, Beatryz Fonseca da, 1988- Avaliação dos efeitos da indução da resposta inflamatória aguda em modelos experimentais bovinos desafiados com LPS endovenoso e vacinação [recurso eletrônico] / Beatryz Fonseca da Silva. - 2024.</p> <p>Orientador: João Paulo Elsen Saut. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.659">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.659</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Saut, João Paulo Elsen, 1975-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Tese de Doutorado PPGCVET Nº 06/2024				
Data:	27 de Agosto de 2024	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	12:15
Matrícula do Discente:	11913VET003				
Nome do Discente:	<b>Beatryz Fonseca da Silva</b>				
Título do Trabalho:	Avaliação dos efeitos da indução da resposta inflamatória aguda em modelos experimentais bovinos desafiados com LPS endovenoso e vacinação.				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Clínica Médica, Cirurgia e Morfologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliações clínicas, epidemiológicas, diagnósticas e terapêuticas das moléstias clínicas dos animais domésticos				

Reuniu-se por vídeoconferência na Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Anna Monteiro Correia Lima - (FAMEV/UFU); Roberta Torres de Melo - (FAMEV/UFU); Andréa Cintra Bastos Tôres Passos - (UFNT); Nadia Simarro Fagundes - (FACULDADE ANHANGUERA DE UBERLÂNDIA); João Paulo Elsen Saut - (UNIUBE) orientador(a) do(a) candidato (a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). João Paulo Elsen Saut, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de [Doutora](#).

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Anna Monteiro Correia Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2024, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Torres de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2024, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nadia Simarro Fagundes, Usuário Externo**, em 28/08/2024, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Cintra Bastos Tôres Passos, Usuário Externo**, em 29/08/2024, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Paulo Elsen Saut, Usuário Externo**, em 05/09/2024, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5622748** e o código CRC **2E93BF13**.

Dedico este trabalho aos meus pais Raimundo  
e Elza, meu esposo Adelson e meu filho José  
pelo estímulo, carinho e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Durante todo o período de doutorado, a cada ano e semestre, Deus colocou alguém para me ajudar, por isso, primeiramente, agradeço a Ele, que é Pai, Filho e Espírito Santo.

Aos meus intercessores Nossa Senhora do Carmo, São José, São Miguel e toda a milícia celeste, que, nos últimos anos, fizeram com que eu me aproximasse cada vez mais da minha religião e dos princípios dela, que me fizeram e fazem ser provada diariamente. Acredito que os caminhos que trilhei me trouxeram a este momento, os quais não foram fáceis, mas, ao lado deles, consegui chegar.

Aos meus pais Raimundo e Elza, não só por terem se esforçado para me formar, mas principalmente por terem abdicado de si próprios para me ajudar nos momentos em que mais precisei.

Ao meu esposo Adelson, por sempre me incentivar nos inúmeros desafios que surgem em nossas vidas.

Ao meu filho José, meu acréscimo do Senhor, pela transformação que fez em nossas vidas. Graças a você, José, a vida da mamãe ficou cheia de cor!

À Dra. Ismênia, que tem cuidado do meu filho com carinho, presteza e solidariedade. Dra. Ismênia, o seu incentivo e suas orientações foram imprescindíveis para o término deste doutorado!

À Dra. Gleice, pelas nossas conversas, que me fazem voltar ao eixo de vários aspectos da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFU, por proporcionar minha qualificação.

Aos professores e coordenadoras, pela dedicação e compreensão.

Aos secretários do Programa, Célia Regina e Lucas, por toda paciência e dedicação ao nos orientar e solucionar as nossas dificuldades.

Aos laboratórios da Universidade Federal de Uberlândia, que permitiram e contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, o Felipe, cujo apoio foi essencial para os nossos resultados.

Aos colegas do LASGRAN, Paula, Amanda, Luísa e Sara. Especialmente, Oglênia e Nadia, minhas companheiras de doutorado, que dividiram comigo não só a condução do estudo como também os momentos de aflição e de alegria. Ao lado de vocês, vivi momentos incríveis e muitas histórias.

À Layane e a LUME, por terem viabilizado o desenvolvimento desta pesquisa, auxiliando-nos em todas as etapas, não apenas na tese, mas em todo o período que compreendeu o doutorado.

À família do Vinícius, por ter cedido os animais e me acolhido durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos profissionais da Cresdsh, Dênis, Kelse, Tiago, Paola e Prof.<sup>a</sup> Rebeca, por terem nos ensinado a arte do laboratório e dos PCRs. Meu período com vocês foi incrível! Não posso mensurar o quanto me ensinaram! Dênis e Rebeca, nunca irei esquecer o que fizeram por mim, pois poucos se dedicariam a ensinar, do básico ao avançado, uma pessoa desconhecida que simplesmente chegou ao laboratório. Dênis, obrigada também por me permitir participar da rotina do laboratório. Saiba que minhas tardes no Cresdsh, apesar de toda a tensão dos processos, eram muito proveitosas.

À Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), por ter concedido meu afastamento para a realização do doutorado, especialmente meu chefe Cláudio, Jansen e Roberto.

Aos amigos do meu eterno Hospital Veterinário (UFNT), Gabriela, Flávia, Samara, Prof.<sup>a</sup> Andréa e Roberto, que saudade de vocês! Prof.<sup>a</sup> Andréa, grandes profissionais se fazem presentes neste momento e você faz parte desse grupo, pois sua paciência e dedicação foram essenciais para a interpretação dos traçados, além das orientações sobre uma vida mais leve e sobre maternar.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, no pessoal da minha chefia imediata, Amário, cuja sensibilidade, empatia, incentivo e promoção de um ambiente acolhedor foram determinantes para a conclusão desta tese.

Aos amigos Gabriela (Enfermeira), Bruno (Médico Veterinário) e Braynna (Irmã), por terem vivido o doutorado junto comigo. Minha fiel plateia de ensaios, discussão de artigos e confecção da apresentação. Ao lado de vocês, treinei e adquiri confiança para continuar.

E, por fim, ao meu orientador de todos os tempos: Prof. João Paulo. Professor, apesar de nos conhecermos há muito tempo, foi no período de doutorado que estreitamos os nossos laços. O senhor é uma referência para mim! Obrigada por aceitar ser meu orientador e por ter tido paciência, persistência e empatia ao longo deste percurso.



“Coloque seu coração de lado. O dever vem primeiro. Mas ao cumprir seu dever, coloque seu coração nele. Isso ajuda.”

(JOSEMARÍA ESCRIVÁ)

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – ARTIGO DE REVISÃO: EFEITOS DA ENDOTOXEMIA AGUDA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM BOVINOS</b> .....	<b>12</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>12</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. LPS</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1.1. A função do lipopolissacarídeo, via de sinalização e imunoativação</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2. Modelos de endotoxemia aguda em bovinos</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.1. Efeito no comportamento e alterações clínicas</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.2. Efeito nas proteínas de fase aguda</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2.3. Efeitos nas citocinas</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2.4. Efeito metabólico</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.5. Alterações cardíacas induzida por LPS</b> .....	<b>26</b>
<b>Referências</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM MODELO DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA INDUZIDO POR VIA ENDOVENOSA COM LIPOPOLISSACARÍDEO DERIVADO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM BEZERROS MISTIÇOS</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1. Introdução</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2. Material e métodos</b> .....	<b>35</b>
2.2.1. Animais e local de estudo .....	35
2.2.2. Delineamento experimental e coleta das amostras .....	36
2.2.3. Avaliação clínica e coleta de sangue .....	37
2.2.4. Medição da pressão arterial indireta.....	38
2.2.5. Eletrocardiograma .....	38
<b>2.3. Análise laboratorial</b> .....	<b>38</b>
2.3.1. Hemograma, glicemia e lactato venoso .....	39
2.3.2. ELISA.....	39
2.3.3. Análise estatística .....	39
<b>2.4. Resultados</b> .....	<b>40</b>
2.4.1. Exame clínico .....	40
2.4.2. Hemograma, glicemia e lactato .....	42
2.4.3. ELISA.....	46
2.4.4. Eletrocardiograma .....	47

<b>2.5. Discussão .....</b>	<b>49</b>
<b>Referências .....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 3 – EVALUATION OF INFLAMMATORY AND PRODUCTION EFFECTS IN VACCINATION OF CROSSBRED DAIRY COWS RAISED IN A TROPICAL CLIMATE .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Introducion.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2. Materials and Methods .....</b>	<b>62</b>
3.2.1 Animals and Study Location .....	62
3.2.2. Experimental design .....	63
3.2.3. Vaccination Management.....	63
3.2.4. Clinical Examination, Assessment of Injection Site, and Milk Production .....	63
3.2.5. Blood Collection and Processing of Whole Blood and Serum.....	64
3.2.6 Protein Profile by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE) Technique .....	64
3.2.7 Statistical Analysis .....	64
<b>3.3. Results.....</b>	<b>65</b>
<b>3.4. Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>References .....</b>	<b>72</b>

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da indução da resposta inflamatória aguda em diferentes categorias bovina de animais mestiços (Gir x Holandes) criadas em clima tropical, conduziu-se dois estudos: a) estudo 1, com objetivo de avaliar os efeitos da endotoxemia induzida experimentalmente com administração intravenosa de LPS derivado de *Escherichia coli* em bezerros leiteiros mestiços; b) estudo 2, com objetivo de avaliar os efeitos da reação inflamatória aguda por meio da vacinação utilizando vacina comercial multivalente, inativada na resposta inflamatória local, sistêmica e na produção de leite de vacas leiteiras mestiças. No estudo 1 foram utilizados 11 bezerros mestiços, de três a oito meses, divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (n=4) e grupo desafio-LPS (n=7). Os animais receberam bolus intravenoso com solução salina ou com LPS derivado de *E. coli* (0111:B4), na dose de 0,5 µg de LPS/kg de peso corporal. Os animais foram avaliados clinicamente e realizado eletrocardiograma, pressão arterial indireta, hemograma completo, glicemia, lactato venoso e citocinas. Os animais desafiados com LPS, apresentaram na resposta sistêmica taquipneia no momento T +1h ( $P=0,026$ ), com aumento de 57,6% ao valor pré desafio e taquicardia no T +3h ( $P=0,020$ ) com aumentos de 31,9%. A administração de LPS reduziu a glicemia 8 horas após o desafio e aumentou as concentrações de lactato venoso. Além disso, houve aumento nas concentrações plasmáticas das citocinas, com picos de IL1 $\beta$  em 1,5 h e IL6 em 3 h após o desafio com LPS. Uma hora após a administração do LPS, 75% dos bezerros apresentaram distúrbios de condução caracterizado por bloqueio atrioventricular de 2º grau e, seis horas após o LPS um bezerro apresentou taquiarritmia ventricular. No estudo 2, foram utilizadas 68 vacas lactantes, sendo 31 primíparas e 37 múltiparas. Os animais foram avaliados com aferição de temperatura retal e da temperatura do local de vacinação, leucograma, proteínas totais e frações, proteína de fase aguda e produção de leite nos dias antes (D-7 e D0) e após a vacinação (D+1, D+3 e D+7). Houve aumento na temperatura retal (D+1), tanto em primíparas ( $P=0,0013$ ) quanto em múltiparas ( $P=0,0002$ ). No momento D+7, todos os animais tiveram reação local. Foi observado reação sistêmica nas vacas múltiparas com leucocitose e neutrofilia no D+1. Os animais do grupo múltiparas apresentaram aumento na concentração sérica de haptoglobina (D+3 e D+7) e de fibrinogênio (D+3). Enquanto, o grupo primíparas apresentou alterações na concentração de fibrinogênio ( $P=0,0101$ ) no D+3. Ambas as categorias apresentaram reduções na produção de leite em D+1, com queda de 10% para primípara e 9.2% nas múltiparas. Os resultados destes estudos sugerem que a administração de LPS derivado de *E. coli* em bezerros mestiços criados em clima tropical (estudo 1) e a vacinação em vacas (estudo 2) induziram alterações clínicas e inflamatórias de uma resposta de fase aguda de curta duração, segura e reprodutível.

**Palavras-chave:** Inflamação, Proteínas de fase aguda, Vacina, LPS, Bezerros, *E. coli*, Eletrocardiograma.

## ABSTRACT

The aim was to evaluate the effects of inducing the acute inflammatory response in different bovine categories of crossbred cattle (Gir x Holstein) raised in a tropical climate. Two studies were conducted: a) study 1, the objective was to evaluate the effects of the local and systemic acute inflammatory response through a single vaccination dose, using an inactivated multivalent commercial vaccine; b) study 2, with the objective of evaluating the effects of experimentally induced endotoxemia with LPS intravenous administration derived from *Escherichia coli* in crossbred dairy calves. In study 1, 68 lactating cows were used, 31 primiparous and 37 multiparous. The animals were evaluated by measuring rectal temperature, vaccination site, white blood cell count, total proteins and fractions, acute phase protein and milk yield on the days before (D-7 and D0) and after vaccination (D+1, D+3 and D+7). There was an increase in rectal temperature (D+1) in both primiparous ( $P=0.0013$ ) and multiparous ( $P=0.0002$ ) cows. At D+7, all animals had a local reaction ( $P<0.0001$ ). Systemic reaction was observed in multiparous cows concerning leukocytosis and neutrophils at D+1. The multiparous cows showed an increase in the serum haptoglobin concentration (D+3 and D+7), and fibrinogen (D+3). While there was a change in fibrinogen ( $P=0.0101$ ) in primiparous cows at D+3. Both categories showed reductions in milk yield at D+1, with a decrease of 10% for primiparous and 9.2% for multiparous. In study 2, 11 crossbred calves aged three to eight months were used and divided into two experimental groups: control group (n.4), and challenge-LPS group (n.7). The animals received an intravenous boluses of saline solution or LPS derived from *E. coli* (0111:B4), at a dose of 0.5 µg of LPS/kg body weight. The general clinical examination, electrocardiogram, indirect blood pressure measurement, complete blood count, glycemia, venous lactate and cytokines were carried out. The group challenged with LPS presented tachypnea at T +1h ( $P= 0.026$ ), with an increase of 57.6% to the pre-challenge value, and tachycardia at T +3h ( $P= 0.020$ ) with an increase of 31.9%. The LPS infusion reduced glucose concentration 8 h after challenge and increased venous lactate concentrations. In addition, the challenge significantly increased plasma concentrations of interleukin IL1β with peaks at 1.5 h and IL 6 at 3 h after LPS challenge. One hour after LPS administration, 75% of calves showed conduction disturbances caused by 2- degree atrioventricular block, and six hours after LPS one animal showed ventricular tachyarrhythmia. The results of these studies suggest that vaccination in cows (study 1) and administration of LPS derived from *E. coli* in crossbred calves raised in a tropical climate (study 2) induced clinical and inflammatory changes of a short-duration acute-phase response, safe and reproducible.

**Keywords:** Inflammation, Acute-phase proteins, Vaccine, LPS, Calves. *E. coli*. Electrocardiogram.

1 **CAPÍTULO 1 – ARTIGO DE REVISÃO: EFEITOS DA ENDOTOXEMIA AGUDA**  
2 **INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM BOVINOS**

3  
4 **Artigo nas normas para publicação na revista**  
5 **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**

6  
7 **Effects of experimentally induced acute endotoxemia in cattle**

8  
9 Beatryz Fonseca da Silva<sup>1,2,3</sup>, Luisa Cunha Carneiro<sup>1</sup>, João Paulo Elsen Saut<sup>1,4\*</sup>

10  
11 <sup>1</sup> Large Animal Health Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade  
12 Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

13 <sup>2</sup> Divisão de Apoio as Atividades de Campo, Universidade Federal do Triângulo  
14 Mineiro, Minas Gerais, Brasil.

15 <sup>3</sup> Clínica Veterinária Universitária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade  
16 Federal do Norte do Tocantins, Tocantins, Brasil

17 <sup>4</sup> Universidade de Uberaba - UNIUBE, Minas Gerais, Brasil.

18  
19 **\* Corresponding author:**

20 *Email address:* [jpsaut.vet@gmail.com](mailto:jpsaut.vet@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-0860-5413>

21  
22 **Resumo**

23 O LPS é um importante componente estrutural da parede celular de bactérias Gram-negativas,  
24 como *Escherichia coli*, sendo um dos componentes imunoestimuladores que induz respostas  
25 inflamatórias e imunes ativando o receptor do tipo toll 4 (TLR4). O modelo animal LPS  
26 apresenta como vantagens a facilidade técnica, padronização e alta reprodutibilidade,  
27 particularmente na resposta inflamatória. Por isso, os desafios de lipopolissacarídeos são  
28 comumente usados em estudos com animais como um modelo para avaliar o efeito de uma  
29 resposta inflamatória de fase aguda, principalmente a imunológica, o estresse e as mudanças  
30 comportamentais durante a doença. A indução de endotoxemia em bovinos provoca uma

31 liberação de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, bem como a manifestação e  
32 exacerbação de sinais clínicos, incluindo, taquicardia, taquipneia, dispneia, febre, anorexia,  
33 hipomotilidade ruminal, diarreia e depressão. Além disso, o modelo de inflamação com LPS  
34 exógeno pode servir como base para investigar o estudo das propriedades imunomoduladoras  
35 de antibióticos, antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais e assim poderia contribuir para o  
36 desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento, com ênfase no bem-estar animal.

37 **Palavras-chave:** LPS, *E.coli*, resposta inflamatória, citocinas.

38

### 39 **Abstract**

40 LPS is an important structural component of the cell wall of Gram-negative bacteria, such as  
41 *Escherichia coli*, being one of the immunostimulatory components that induce inflammatory  
42 and immunological responses by activating the toll-like receptor 4 (TLR4). The LPS animal  
43 model has the advantages of technical ease, standardization, and high reproducibility,  
44 particularly in the inflammatory response. Therefore, lipopolysaccharide challenges are  
45 commonly used in animal studies as a model to evaluate the effect of an acute phase  
46 inflammatory response, particularly immunological, stress and behavioral changes during  
47 illness. The induction of endotoxemia in cattle causes a release of pro-inflammatory cytokines  
48 and acute phase proteins, as well as a manifestation and exacerbation of clinical signs, including  
49 tachycardia, tachypnea, dyspnea, fever, anorexia, rumen hypomotility, diarrhea and depression.  
50 Furthermore, the inflammation model with exogenous LPS can serve as a basis for investigating  
51 the study of the immunomodulatory properties of antibiotics, steroidal and non-steroidal anti-  
52 inflammatory drugs and could thus contribute to the development of better treatment strategies,  
53 with an emphasis on animal welfare.

54 **Keywords:** LPS, *E.coli*, inflammatory response, cytokines.

55

### 56 **1.1. LPS**

57

58 As bactérias Gram-negativas são caracterizadas por um envelope celular que contém  
59 duas membranas: uma interna, que envolve os componentes citoplasmáticos, e uma externa,  
60 que separa a célula do seu ambiente. Essas duas membranas circundam um compartimento  
61 celular aquoso, denominado periplasma, que contém a parede celular do peptidoglicano  
62 (Silhavy et al., 2010).

63 A membrana celular externa das bactérias Gram-negativa é composta de uma bicamada  
64 assimétrica de fosfolípidios no folheto interno e de moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) no  
65 folheto externo (Bertani & Ruiz, 2018; Silhavy et al., 2010).

66 O LPS é um importante componente estrutural da parede celular das bactérias Gram-  
67 negativas, que pode provocar uma resposta inflamatória robusta e características no hospedeiro,  
68 que pode resultar em síndrome do choque tóxico (Bertani & Ruiz, 2018; Lohuis et al., 1988a).  
69 Os LPS normalmente consistem em três partes: um domínio hidrofóbico, conhecido como  
70 lipídio A (ou endotoxina); um oligossacarídeo “central” não repetitivo e uma cadeia lateral (ou  
71 antígeno O) (Raetz et al., 2007).

72 O lipídio A, a porção hidrofóbica da molécula, é um dissacarídeo de glucosamina ligado  
73 a  $\beta$ -1'-6 acilado, que forma o folheto externo da parede externa. Em *Escherichia coli* (*E. coli*)  
74 e *Salmonella spp.*, as glucosaminas são fosforiladas nas posições 1 e 4' e aciladas nas posições  
75 2, 3, 2' e 3', com duas cadeias acil secundárias adicionais, normalmente presentes na  
76 glucosamina distal, de modo que o lipídeo A maduro é principalmente hexa-acilado (Raetz et  
77 al., 2007). Dos três componentes, o lipídio A é o componente mais bioativo do LPS sendo o  
78 principal Padrão Molecular Associado a Patógeno (PAMP) do LPS (Lu et al., 2008) .

79 O oligossacarídeo central é um oligossacarídeo não repetitivo que está ligado às  
80 glucosaminas do lipídio A. Essa estrutura central geralmente contém resíduos de ácido 3-  
81 desoxi-D-mano-oct-2-losônico (Kdo), heptoses e várias hexoses, que podem ser modificadas  
82 com fosfatos e outros substituintes, como fosfoetanolamina (Klein & Raina, 2015; Raetz et al.,  
83 2007). O antígeno O consiste em muitas repetições de uma unidade de oligossacarídeo,  
84 composto de dois a oito açúcares, que está ligado ao oligossacarídeo central (Kalynych et al.,  
85 2014; Wang et al., 2010). A composição do antígeno O podem diferir tanto dentro de uma  
86 espécie até o nível da estirpe, como, em algumas bactérias Gram-negativas que não sintetizam  
87 este componente do LPS. Nesses casos, as moléculas compostas apenas pelo lipídeo A e pelo  
88 oligossacarídeo central são normalmente chamadas de lipooligossacarídeos (Bertani & Ruiz,  
89 2018; Klein & Raina, 2015; Raetz et al., 2007).

90

### 91 **1.1.1. A função do lipopolissacarídeo, via de sinalização e imunoativação**

92

93 O LPS desempenha diversas funções nas bactérias Gram-negativas, (a) como um  
94 componente estrutural importante da membrana externa, por participar como uma barreira de  
95 permeabilidade eficaz contra moléculas pequenas e hidrofóbicas, que, de outra forma, podem



96 atravessar as bicamadas fosfolipídicas, tornando essas bactérias inatamente resistentes a muitos  
97 compostos antimicrobianos (Zhang et al., 2014); (b) como um componente essencial do  
98 envelope celular da maioria das bactérias Gram-negativas (Nikaido, 2003), (c) além de  
99 desempenhar um papel crucial nas interações bactéria–hospedeiro, modulando as respostas do  
100 sistema imunológico do hospedeiro (Bertani & Ruiz, 2018) .

101 A função de barreira do LPS decorre, em parte, da sua forte natureza anfipática. Como  
102 em outras bicamadas lipídicas, a porção acila do lipídio A proporciona um caráter hidrofóbico,  
103 que inibe a passagem de moléculas hidrofílicas por meio da membrana externa. No entanto, em  
104 contraste com outras bicamadas, o oligossacarídeo central e o antígeno O fornecem  
105 adicionalmente um extenso caráter hidrofílico ao LPS, o que torna a membrana externa  
106 particularmente impermeável também a compostos hidrofóbicos (Nikaido, 2003).

107 O LPS se compacta densamente no folheto externo da parede externa, mediado, em  
108 parte, pela associação das cadeias acil do lipídio A, impulsionada pela hidrofobicidade. Como  
109 as moléculas do lipídio A normalmente carregam um grande número, isto é, porções de ácidos  
110 graxos saturados, as extensas interações entre essas cadeias acil resultam em baixa fluidez  
111 dentro da bicamada da membrana (Nikaido, 2003). No entanto, o empacotamento do LPS é  
112 complicado pela presença de grupos fosfato carregados negativamente em toda a sua estrutura.  
113 Mais salientes e conservados são os fosfatos das posições 1 e 4' das glucosaminas no lipídio A,  
114 que se encontram na superfície exterior da membrana externa, mas os fosfatos também podem ser  
115 encontrados no oligossacarídeo central. Para evitar a repulsão entre esses fosfatos carregados  
116 negativamente, cátions divalentes, como o  $Mg^{2+}$ , intercalam-se entre as moléculas de LPS,  
117 formando interações poli-iônicas, que melhoram muito o empacotamento do LPS e,  
118 conseqüentemente, promovem a função de barreira da parede externa (Nikaido, 2003; Raetz et  
119 al., 2007)

120 O LPS é um dos componentes imunoestimuladores de bactérias mais bem estudados e  
121 pode induzir inflamação sistêmica e sepse se ocorrerem sinais excessivos (Lu et al., 2008). Ele  
122 tem sido classicamente denominado endotoxina, em referência à toxicidade associada às células  
123 (endo), observada em muitos organismos Gram-negativos. Compreensivelmente, o sistema  
124 imunológico do hospedeiro evoluiu para responder principalmente à característica mais  
125 conservada do LPS, a estrutura do lipídio A, para a qual o receptor Toll-Like 4 (TLR4) é um  
126 sensor importante para o LPS (Bertani & Ruiz, 2018; Lu et al., 2008).

127 Alguns organismos escapam à resposta imunológica do hospedeiro, mascarando os  
128 aspectos mais conservados do seu LPS, com um antígeno O altamente variável. Apesar desse

129 antígeno induzir a produção de anticorpos, o comprimento de sua cadeia impede a deposição  
130 de complemento, mediada por anticorpos na superfície da célula bacteriana, e,  
131 conseqüentemente, a sua estrutura protege as bactérias da lise pelo complemento. A posse de  
132 um antígeno O também demonstrou contribuir para a evasão da fagocitose do patógeno pelas  
133 células do sistema imunológico (Bertani & Ruiz, 2018).

134 A imunoativação pode ser modelada experimentalmente pela administração de LPS.  
135 Esse modelo não utiliza bactérias vivas, portanto, nenhuma infecção ativa é estabelecida, mas  
136 as vias imunológicas do hospedeiro são ativadas para fornecer informações sobre as vias básicas  
137 (Lu et al., 2008; Bertani & Ruiz, 2018; Dickson & Lehmann, 2019). Assim, o impacto da  
138 inflamação, nas diferentes vias metabólicas, pode ser investigado usando um modelo  
139 reprodutível de inflamação aguda, que consiste na administração de endotoxina (Plessers et al.,  
140 2015). A administração de endotoxinas podendo ser realizada por via intravenosa (Plessers et  
141 al., 2015), intramamária (Opgenorth et al., 2024), intraperitoneal (Abraham et al., 1999) ou  
142 instilação traqueal (Asti et al., 2000).

143 A imunoativação se inicia quando os padrões moleculares de patógenos invasores (por  
144 exemplo, bactérias, vírus, leveduras e parasitas) ativam o sistema imunológico do hospedeiro a  
145 usar os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), em células sentinelas imunológicas,  
146 para detectar os patógenos invasores (Lu et al., 2008). As estruturas bacterianas conservadas  
147 são identificadas como estranhas por várias famílias importantes de receptores e são  
148 reconhecidas pelas células do sistema imunológico, provocando a transcrição e a produção de  
149 citocinas inflamatórias, o que resulta em uma resposta de fase aguda caracterizada por febre,  
150 alterações no número de leucócitos circulantes e síntese de proteínas de fase aguda (Carroll et  
151 al., 2009a; Plessers et al., 2015).

152 O LPS é o principal PAMP de bactérias Gram-negativas e, como tal, muitas pesquisas  
153 sobre endotoxemia têm se concentrado na sua utilização. O LPS derivado de *E. coli* é a escolha  
154 mais comum para experimentos de endotoxemia (Carroll et al., 2009a; Plessers et al., 2015),  
155 mas outras espécies como *Salmonella ssp.* também são utilizadas (Ballou et al., 2008).  
156 Dependendo da natureza da experiência, o conhecimento detalhado do sorotipo de LPS pode  
157 não ser crítico, mas a potência de cada um deve ser avaliada individualmente. Isso porque as  
158 mudanças estruturais podem afetar o resultado se a virulência, a evasão imunológica ou a  
159 resistência aos antibióticos forem afetadas (Bertani & Ruiz, 2018).

160 A sinalização imunológica em resposta ao LPS envolve, principalmente, a interação do  
161 LPS com receptores específicos de células imunes. A família de receptores TLR está envolvida

162 no desencadeamento de respostas imunes inatas em mamíferos. Foram descritos cinco TLRs,  
163 que contêm repetições extracelulares ricas em leucina, para o reconhecimento de PAMPs  
164 bacterianos e, uma porção citoplasmática para a sinalização intracelular (Lu et al., 2008).

165 O LPS ativa o TLR4 e o fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2), uma proteína  
166 associada necessária para a sinalização do LPS. A proteína de ligação ao lipopolissacarídeo  
167 sérico e o CD14 associado à membrana (mCD14) atuam como proteínas acessórias para  
168 permitir que o LPS se ligue ao seu receptor de células imunes inatas. O LPS se liga a uma bolsa  
169 hidrofóbica no MD-2, por meio de uma interação com cadeias de ácidos graxos do lipídio A. A  
170 ligação do LPS resulta na formação de multímeros, consistindo em duas cópias do complexo  
171 TLR4-MD-2 e uma ponte LPS. As proteínas adaptadoras são então recrutadas para o domínio  
172 intracelular do complexo, que ativa as vias dependentes e independentes de MyD88. O par de  
173 adaptadores, TIRAP-MyD88, ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e as proteínas quinases  
174 ativadas por mitógeno (MAPKs) causando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Lu et al.,  
175 2008).

176 O complexo receptor LPS também pode sofrer endocitose mediada por clatrina e  
177 dinamina e induzir sinalização de dentro do endossomo por meio de um segundo par de  
178 proteínas adaptadores: TRAM-TRIF que ativam os interferon tipo 1 (Kagan et al., 2008). O  
179 CD14 desempenha um papel em ambas as vias de transdução de sinal, pois está envolvido no  
180 tráfego de LPS e na internalização do receptor (Lu et al., 2008). Vale ressaltar que a sinalização  
181 de LPS é, de forma clara, um processo altamente envolvido, com muitas consequências  
182 imunológicas de interesse na sepse (Michaeli et al., 2012).

183

## 184 **1.2. Modelos de endotoxemia aguda em bovinos**

185

186 A resposta inflamatória pode ser reproduzida pela administração exógena de LPS  
187 (Plessers et al., 2015). Esse modelo tem sido usado para avaliar o efeito de uma resposta de fase  
188 aguda, principalmente a imunológica, o estresse e comportamento doentio (Borderas et al.,  
189 2008; Carroll et al., 2009b; Waldron et al., 2003). A resposta de fase aguda é um componente  
190 da defesa inata do corpo, que é caracterizada por reações variadas, à inflamação (Carroll et al.,  
191 2009a), à infecção ou doença ou ao trauma (Buras et al., 2005; Deitch, 1998).

192 O modelo de endotoxemia envolve a indução de uma resposta inflamatória robusta e  
193 imediata à ativação do sistema imunológico. O uso do modelo de indução com LPS em animal  
194 apresenta diversas vantagens, incluindo a facilidade técnica, padronização e a alta

195 reprodutibilidade na resposta inflamatória desencadeada (Remick et al., 2000). Logo após a  
196 administração de LPS, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias são liberados e podem ser  
197 medidos no soro circulante, contudo, como situações limitantes, temos a dependência da toxina,  
198 a dose e a via de administração que difere da sepse clínica (Cavaillon, 2018; Deitch, 1998;  
199 Remick et al., 2000). O LPS pode ser utilizado para estudar os processos fisiopatológicos da  
200 endotoxemia ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica e como modelo de choque  
201 endotóxico, mas não é útil para o modelo de sepse em geral (Buras et al., 2005; Cavaillon, 2018;  
202 Deitch, 1998; Dickson et al., 2019).

203 Embora os modelos de endotoxemia não tenham a complexidade observada nos  
204 modelos infecciosos, eles têm utilidade na pesquisa pré-clínica, especificamente no exame de  
205 processos inflamatórios, que ocorrem nos estágios iniciais da sepse e no trabalho mecanístico.  
206 O conhecimento dos mecanismos e das vias de sinalização envolvidos na patogênese de  
207 patógenos (agentes) específicos é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias  
208 (Dickson et al., 2019; Wyns et al., 2015). Os modelos de endotoxina bovina podem, portanto,  
209 fornecer uma primeira indicação das ações potenciais de anti-inflamatórios esteroidais (Plessers  
210 et al., 2015), não esteroidais (Wyns et al., 2015) e antimicrobianos (Plessers et al., 2015; Wyns  
211 et al., 2015) que podem ser posteriormente avaliadas em modelos experimentais de infecção  
212 bacteriana e em condições de campo.

213 O LPS tem sido usado para induzir endotoxemia em ratos (Iwase et al., 2001),  
214 camundongos (Tan et al., 2019), porquinhos da Índia (Aoki et al., 2012), suínos (Bergman et  
215 al., 2023; Kreimeier et al., 1993) e bovinos (Ballou et al., 2008; Borderas et al., 2008; Constable  
216 et al., 1991; Plessers et al., 2015; Sanchez et al., 2015).

217 Assim, como em outras espécies, suínos também são utilizados como modelo  
218 experimental para choque endotoxêmico. Kreimeier et al. (1993) e Bergman et al. (2023)  
219 utilizaram suínos como modelo confiável de indução experimental para choque endotoxêmico,  
220 a partir de infusão de LPS, e relataram alterações frequentemente observadas em pacientes com  
221 choque séptico, incluindo instabilidade hemodinâmica, insuficiência respiratória e acidose.

222 Além disso, algumas bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, também são  
223 responsáveis por muitas outras doenças em ruminantes, como mastite, metrite, septicemia  
224 neonatal, doenças respiratórias, além da pasteurelose e salmonelose (Constable, 2017). Além  
225 disso, endotoxinas estão associadas a doenças não infecciosas, como acidose ruminal, laminite  
226 e deslocamento de abomaso (Jacobsen et al., 2004).

227 Como consequência da marcante semelhança entre os efeitos sistêmicos das infecções  
228 bacterianas Gram-negativas e aqueles provocados por um desafio exógeno de LPS, os modelos  
229 de endotoxinas têm sido amplamente aplicados na pesquisa veterinária para estudar os diversos  
230 aspectos da resposta de fase aguda (Plessers et al., 2015). Um modelo confiável de inflamação  
231 induzido por LPS foi estabelecido em bezerros holandeses, pois apresentaram todos os aspectos  
232 da resposta de fase aguda (Carroll et al., 2009a; Plessers et al., 2015).

233 A esse respeito, uma resposta de fase aguda, induzida por LPS em bezerros, pode servir  
234 como modelo para investigar a influência de drogas na liberação de citocinas pró-inflamatórias  
235 e proteínas de fase aguda (APPs), bem como nos sinais clínicos, incluindo dispneia, febre,  
236 anorexia e depressão (Coskun & Sen, 2012; Jacobsen et al., 2004; Plessers et al., 2015). Além  
237 disso, essa informação poderia contribuir para o desenvolvimento de melhores estratégias de  
238 tratamento, com ênfase no bem-estar.

239 Segundo Carroll et al. (2009a), a exposição à endotoxina bacteriana induziu uma  
240 resposta de fase aguda pronunciada em bovinos. Além disso, a necessidade de modelos de  
241 inflamação bovina, que não envolvam bactérias ativas, para o estudo das propriedades  
242 imunomoduladoras de antibióticos e anti-inflamatórios (Plessers et al., 2015), considerando que  
243 um modelo de infecção realizado na circulação sanguínea terá o maior efeito imediato no  
244 endotélio e no sistema vascular, com posterior semeadura de órgãos (Buras et al., 2005). O que  
245 ocasiona o desenvolvimento de uma resposta imediata com a síndrome da resposta inflamatória  
246 sistêmica e à subsequente mortalidade dependente da dose (Recknagel et al., 2013; Stortz et al.,  
247 2017). No entanto, o modelo de indução com LPS não reproduz exatamente as características  
248 da sepsé humana, com respostas de citocinas mais precoces e maiores e com duração mais curta  
249 (Buras et al., 2005).

250 Segundo Jacobsen et al. (2004), o desafio de LPS em baixas doses em vacas holandesas  
251 são provavelmente relevantes em estudos que visam imitar a resposta de fase aguda provocada  
252 durante o curso de doenças associadas ao LPS de ocorrência natural. A resposta ao LPS foi  
253 caracterizada por depressão; anorexia; hipertermia; taquipneia; taquicardia; hipomotilidade  
254 ruminal; diarreia e leucopenia, seguida de leucocitose; trombocitopenia; hipocalcemia;  
255 hipoferremia e hipozincemia; seguida por uma curta hiperzincemia. Com isso, esses autores  
256 mostraram que níveis muito baixos de LPS (10 µg/KG) induzem uma resposta de fase aguda.

257

### 258 **1.2.1. Efeito no comportamento e alterações clínicas**

259

260 A administração de LPS pode ser utilizada para estudar o comportamento doentio  
261 (Borderas et al., 2008; Waldron et al., 2003) afinal, um dos problemas no estudo das respostas  
262 comportamentais às doenças é a dificuldade em estabelecer o marco temporal do começo do  
263 processo. Segundo Borderas et al. (2008), uma das principais vantagens de usar doses reduzidas  
264 de LPS, para modelar o comportamento precoce da doença, é o desencadeamento claro da fase  
265 inicial, no entanto, é improvável que o curso temporal das mudanças de concentrações do LPS  
266 no sangue modelaria o período natural de ocorrência da doença. No entanto, essa desvantagem  
267 é reduzida quando se utilizam doses baixas de LPS para mimetizar o início da doença.

268 Borderas et al. (2008), utilizando doses de 0,025 ou 0,05 µg/kg de LPS, observaram a  
269 presença imediata de sinais clínicos e sua curta duração em comparação com as doenças  
270 adquiridas naturalmente. As doses baixas de LPS podem imitar baixas concentrações de  
271 endotoxina circulante, causadas por bactérias Gram-negativas. Portanto, as mudanças  
272 comportamentais dos bezerros, após serem expostos a doses leves de LPS, que envolvem  
273 alterações no comportamentos de autolimpeza, ruminação e ingestão de feno, são reduzidas,  
274 enquanto o tempo gasto deitado e em pé inativo é aumentado, e essas alterações podem ser  
275 compatíveis com o início de algumas doenças infecciosas.

276 Plessers et al. (2015) sugerem o estabelecimento de três fases comportamentais:  
277 respiratória, depressão e recuperação, nos bezerros holandeses, após uma injeção intravenosa  
278 em bolus de 0,5 µg/kg de LPS, com base na pontuação da condição clínica dos animais durante  
279 as primeiras nove horas do experimento. O início da fase respiratória é caracterizado pelo  
280 aparecimento de dispneia; já a melhora do desconforto respiratório, por outro lado, marca o fim  
281 dessa primeira fase e, simultaneamente, indica o início da fase de depressão, que termina  
282 quando o estado de alerta é recuperado, iniciando a fase de recuperação. O momento em que o  
283 bezerro se levanta é denominado final dessa última fase e, conseqüentemente, indica a  
284 recuperação total do bezerro. Essas observações enfatizam a importância do reconhecimento da  
285 depressão na detecção precoce da doença.

286 Os primeiros sintomas clínicos, após a administração em *bolus* de LPS (0,5 µg/kg),  
287 começaram em  $17,9 \pm 3,1$  min, com dispneia, tosse e estridor. Esse início precoce da fase  
288 respiratória pode ser explicado pelo papel do pulmão como o principal órgão alvo da endotoxina  
289 em bovinos, resultando rapidamente em um aumento do impulso respiratório, dispneia, edema  
290 pulmonar difuso e congestão, além de hemorragias nas vias aéreas. Vale ressaltar que a taxa de  
291 respiração aumentou acentuadamente após a infusão de LPS (Plessers et al., 2015).

292 Em relação à temperatura corporal dos animais desafiados com LPS, observou-se  
293 aumento com elevação máxima de 39,4 °C, às 4-5 horas depois da infusão de LPS. No entanto,  
294 observou-se uma variação no tempo de resposta térmica: enquanto um grupo de animais  
295 apresentou elevação precoce da temperatura corporal, em menos de cinco horas, outro grupo  
296 apresentou o aumento após seis horas da infusão de LPS, apesar de todos terem recebido a  
297 mesma dose de 0,5 µg/kg (Plessers et al., 2015).

298 O efeito da infusão de LPS, com quatro doses (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 µg/kg) em vacas  
299 holandesas, promoveu um aumento da temperatura corporal periférica. Embora o LPS tenha  
300 induzido febre, os animais que receberam a maior quantidade de LPS não tiveram um maior  
301 aumento na temperatura retal. Houve aumento da frequência respiratória, com pico de 1,5 hora,  
302 e retorno aos níveis pré-infusão 4 horas depois do desafio (Waldron et al., 2003). A temperatura  
303 retal em vacas holandesas atingiu pico em padrões monofásico, bifásico e trifásico, em desafios  
304 com 10, 100 e 1.000 ng LPS/kg, respectivamente (Jacobsen et al., 2004). A indução da febre no  
305 modelo de inflamação induzido por LPS possui como importante mediador pirogênico a  
306 prostaglandina E2 (PGE2) (Evans et al., 2015). O desenvolvimento da febre seria um  
307 componente da resposta controlada do animal para melhorar as respostas imunológicas, limitar  
308 o crescimento do patógeno e ajudar na sobrevivência (Evans et al., 2015).

309 O desenvolvimento de febre em novilhos Angus, após o desafio do LPS na dose de 2,5  
310 µg/kg, apresentou aumento evidente 1 hora após o desafio, com pico às 4,5 horas após o LPS,  
311 e depois diminuiu aos níveis pré-desafio. No entanto, Carroll et al. (2009a) observaram  
312 temperatura retal acima dos valores pré-desafio mesmo 8 horas após a exposição à endotoxina.  
313 Novilhos holandeses, que receberam a administração de Dextrose antes do desafio com LPS  
314 nas doses de 0,5 µg/kg diminuiu a resposta da temperatura retal ao desafio com LPS (Sanchez  
315 et al., 2015).

316 Efeitos bifásicos também foram relatados na frequência cardíaca (FC) de bezerros  
317 holandeses desafiados por LPS, na dose de 0,5 µg/kg, com comportamentos diferentes entre os  
318 animais, atingindo a FC máxima em 5 horas, com  $118 \pm 12$  bpm (Plessers et al., 2015). Carroll  
319 et al. (2009a) descreveram aumentos acentuados 30 minutos após o LPS com retorno aos  
320 valores pré-desafio em 2,5 horas.

321 Efeitos negativos na motilidade ruminal foram observados em vacas holandesas depois  
322 do desafio endovenoso com 100 e 1.000 ng LPS/kg, os animais experimentaram estase ruminal  
323 de curta duração, com retorno aos níveis de pré-injeção de 24 horas a 36 horas (Jacobsen et al.,  
324 2004).

325 Em outro estudo, a infusão de LPS, na circulação sanguínea periférica de vacas  
326 primíparas holandesas, alterou os grupos bacterianos ruminais e o pH ruminal. Além disso, sua  
327 fermentação provocou a uma diminuição geral na atividade fermentativa. Esses resultados  
328 implicam que o LPS, translocado durante a acidose ruminal, pode agravar a disfunção do  
329 rúmen, o que resulta em um duplo prejuízo para a saúde ruminal em bovinos leiteiros (Jing et  
330 al., 2014).

331 Waggoner et al. (2009) observou em novilhos de corte (Angus) desafiados com infusão  
332 intravenosa de LPS (1,5µg/KG/PC) uma redução da motilidade ruminal. Assim como, (Lohuis  
333 et al., 1988b), que observou diminuição da intensidade e frequência das contrações ruminais  
334 após o desafio com LPS em vacas holandesas. A redução da digestão ruminal pode levar ao  
335 acúmulo de ácidos graxos voláteis que pode resultar na queda do pH ruminal e assim induzir a  
336 desequilíbrio de sua microbiota (Waggoner et al., 2009). Além disso, em novilhos (Angus x  
337 Hereford) a administração de 0,5µg/KG LPS reduziu transitoriamente a produção de leite, em  
338 volume, por meio de reações fisiológicas que modulam a motilidade gastrointestinal e os  
339 centros de saciedade no sistema nervoso central (Lippolis et al., 2017).

340

### 341 **1.2.2. Efeito nas proteínas de fase aguda**

342

343 As proteínas de fase aguda (APP) são proteínas do sangue sintetizadas, principalmente,  
344 pelos hepatócitos como parte da resposta de fase aguda. A resposta de fase aguda faz parte do  
345 sistema imunológico inato e é provocado por diferentes estímulos, incluindo trauma, infecção,  
346 estresse, neoplasia e inflamação. A resposta de fase aguda resulta em uma reação sistêmica  
347 complexa com o objetivo de restabelecer a homeostase e promover a cura (Petersen et al., 2004).  
348 Alterações na APP, em modelos experimentais de infecção e doenças inflamatórias bovinas, são  
349 relatadas e importantes no monitoramento da inflamação (Hughes et al., 2014; Plessers et al.,  
350 2015; Waggoner et al., 2009).

351 O efeito da indução de endotoxemia por LPS, em bezerros desafiados com 0,5 µg/kg,  
352 promoveu um pico de concentrações plasmáticas de proteínas de fase aguda como amiloide  
353 sérica A (SAA), às 24 h, e de haptoglobina, às 18 h (Plessers et al., 2015). Assim como Boosman  
354 et al. (1989) que relataram aumentos significativos na concentração de SAA às 5h com picos  
355 entre 17 e 20 h após o desafio com LPS (0,15 µg/kg, IV) e Coskun e Sen (2012) ao induzir  
356 clinicamente a endotoxemia em bezerros holandeses, por meio da administração intravenosa de  
357 LPS, na dose de 0,1 µg/kg. Além disso, a exposição à endotoxina de LPS em novilhos Angus



358 resultou em um aumento prolongado nas concentrações de SAA, detectável 3 horas e  
359 permanecendo até 8 horas após o desafio (Carroll et al., 2009a). Já as concentrações de  
360 ceruloplasmina, apresentaram redução aguda em 2 horas após a infusão de LPS (Carroll et al.,  
361 2009a).

362 Jacobsen et al. (2004) mostraram que em vacas holandesas as concentrações séricas de  
363 haptoglobina e SAA aumentaram significativamente acima dos níveis basais pré-desafio de 6 a  
364 36 horas após o desafio intravenoso de doses crescentes (10, 100 e 1000 ng/kg,  
365 consecutivamente) de LPS de *Escherichia coli*, com intervalos de 3 semanas, respectivamente,  
366 bem como, as concentrações permaneceram elevadas por até 144 horas. Diante desse cenário a  
367 SAA atingiu o pico e caiu para os níveis pré-desafio mais rapidamente do que as concentrações  
368 de haptoglobina. Após os 3 desafios intravenosos com LPS, as concentrações de albumina, uma  
369 proteína de fase aguda negativa, diminuíram de forma bifásica, apresentando uma queda aguda  
370 com duração de 6 horas, seguida de um retorno aos valores basais e, eventualmente, uma  
371 diminuição mais pronunciada a partir de 36 h com retorno aos níveis basais em até 144 h após  
372 o desafio. A diminuição aguda e de curta duração, nas concentrações de albumina, tornou-se  
373 sucessivamente mais pronunciada, com cada aumento na dose de LPS, enquanto a magnitude  
374 da segunda diminuição prolongada não diferiu entre os desafios com 100 e 1.000 ng LPS/kg.  
375 Pode ser que a capacidade de síntese de APP do fígado já havia sido alcançada no segundo  
376 desafio (100ng/kg), o que sugere uma limitação na capacidade de secreção das citocinas  
377 (Jacobsen et al., 2004).

378 Chandler et al. (2022) observaram em vacas no período de pós-parto aumentos de quatro  
379 vezes da SAA 24 h e de duas vezes a concentração de haptoglobina em 48 h após o LPS.

380 A infusão de LPS em vacas holandesas de meia lactação indicaram uma indução da  
381 resposta inflamatória com aumento das concentrações plasmáticas de proteínas de fase aguda  
382 como a amilóide sérica A, ceruloplasmina e haptoglobina (Ning et al., 2017).

383

### 384 **1.2.3. Efeitos nas citocinas**

385

386 A imunidade inata desempenha um papel importante no mecanismo de defesa inicial do  
387 organismo e serve para iniciar a resposta imune adquirida. O sistema imune inato é muito  
388 diversificado e inclui barreiras físicas, fagócitos, complemento e receptores toll-like que servem  
389 para prevenir infecções, eliminar potenciais patógenos e iniciar o processo inflamatório  
390 (Petersen et al., 2004). As respostas inatas induzidas dependem de citocinas e quimiocinas, que

391 são geradas por células ativadas, incluindo monócitos, macrófagos, fibroblastos, endotélio,  
392 plaquetas, queratinócitos e células T (Tizard, 2019). O LPS é um potente indutor de inflamação  
393 e pode promover o aumento da concentração de diversos mediadores inflamatórios, contendo  
394 interleucina (IL)-1 $\beta$  (Carroll et al., 2009), IL6 (Plessers et al., 2015; Waldron et al., 2003), IL-  
395 10 (Hughes et al., 2014) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Plessers et al., 2015), que  
396 contribui para respostas inflamatórias teciduais e desenvolvimento de doenças

397 A injeção em *bolus* de LPS resulta em um efeito muito rápido e aumento transitório nos  
398 níveis sistêmicos das citocinas (Carroll et al., 2009a; Plessers et al., 2015). É importante notar  
399 que a sepsé clínica difere dessa resposta, mostrando uma elevação prolongada da concentração  
400 de citocinas sistêmicas, que são várias de magnitude inferiores aos modelos de endotoxícose  
401 (Cavaillon, 2018).

402 Após o desafio com LPS em bezerros holandeses, as concentrações plasmáticas dos  
403 mediadores inflamatórios aumentaram significativamente com os níveis de citocinas,  
404 normalizando dentro de 8 horas, enquanto as APPs retornaram às concentrações pré-desafio em  
405 de 54 horas. Os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram, com pico em 1 hora. As concentrações máximas  
406 de IL-6 foram registradas posteriormente às 3,5 horas (Plessers et al., 2015).

407 Os efeitos do LPS em vacas holandesas, nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , foram  
408 dependentes da dose e aumentaram significativamente em 1 hora após a administração de LPS  
409 e retornaram aos níveis basais em 5 horas (Waldron et al., 2003). Este fato também ocorreu em  
410 novilhos holandeses desafiados por via intravenosa na dose de 0,5 $\mu$ g/kg de LPS, permanecendo  
411 elevadas durante 2,5 horas antes de retornar aos valores basais (Sanchez et al., 2015). Em  
412 resposta à administração de LPS, as concentrações de IL-6 aumentaram 1,5 horas após a  
413 administração de LPS. As concentrações pós-LPS de IL-6 foram maiores em novilhos sem  
414 tratamento com dextrose e lipídios, respectivamente, de 4.289  $\pm$  197 pg/ml e 2.762  $\pm$  197 pg/ml  
415 e 1.214  $\pm$  212 pg/ml. De acordo com Sanchez et al. (2015), o aumento na disponibilidade de  
416 energia, proporcionado pelo tratamento com dextrose e lipídios, foi capaz de reduzir a resposta  
417 da IL-6 ao LPS.

418 Já Carroll et al. (2009a) observou aumento das concentrações séricas de TNF-  $\alpha$  e IL-6  
419 duas horas após a administração intravenosa de 2,5 $\mu$ g/kg de LPS em novilhos Angus. Enquanto  
420 as concentrações séricas de IFN-  $\gamma$  e IL-1  $\beta$  aumentaram com o tempo (3 a 4,3 h) após o LPS  
421 (Carroll et al., 2009a).

422

#### 423 1.2.4. Efeito metabólico

424

425 Os distúrbios metabólicos também acompanham as manifestações clínicas de  
426 endotoxemia. A anorexia, bem como as alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras,  
427 proteínas e minerais são todos componentes da resposta patológica provocada pelo LPS. A  
428 resposta metabólica à sepse bacteriana ou à administração de LPS é mediada principalmente  
429 por citocinas e controle endócrino e há pouco efeito da endotoxina diretamente nos tecidos Cabe  
430 destacar que a endotoxemia provoca uma série de efeitos neuroendócrinos e metabólicos, assim  
431 como desencadeia respostas imunológicas que fazem parte dos mecanismos de defesa do  
432 hospedeiro (Gomez et al., 2019).

433 Waldron et al. (2003) avaliaram os efeitos do LPS sobre o metabolismo de vacas  
434 holandesas, utilizando quatro diferentes doses (0,0, 0,5, 1,0 e 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; LPS; *Escherichia*  
435 *coli* (0111:B4), observaram uma perda transitória da ingestão de matéria seca em até oito horas  
436 após a infusão e a produção de leite com retorno aos níveis pré-infusão de 48 horas a 72 horas  
437 após a infusão. A concentração plasmática de cortisol aumentou, de maneira dependente da  
438 dose, após a infusão intravenosa de LPS em vacas no meio da lactação. Ou seja, a ativação  
439 imunológica por LPS, administrado via intravenosa em vacas holandesas, resultou em  
440 alterações significativas dependente da dose nas medidas produtivas, clínicas e metabólicas em  
441 vacas leiteiras, no meio da lactação. Estes resultados indicam que os aspectos do metabolismo  
442 energético, importantes para a saúde metabólica, são alterados após a ativação imunológica e  
443 sugerem possíveis mecanismos para a relação associativa entre doenças infecciosas e distúrbios  
444 metabólicos em bovinos leiteiros.

445 Além disso, aumentos no cortisol foram observados em resposta ao desafio com LPS,  
446 sendo uma das primeiras alterações endócrinas esperadas e que ocorreram antes de aumentos  
447 detectáveis nas citocinas (Carrol et al., 2009). Dessa forma, a liberação precoce de cortisol serve  
448 para preparar e estimular a resposta pró-inflamatória, enquanto a elevação prolongada do  
449 cortisol, ao longo do tempo, leva à regulação negativa da resposta pró-inflamatória (TNF- $\alpha$  e  
450 IL-6) e à estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-2, IL-4 e IL-10)  
451 (Hughes et al., 2013). Diante disso, o cortisol é um componente crítico na regulação da resposta  
452 pró-inflamatória, de modo que previne um estado hiperinflamatório, que pode ser prejudicial à  
453 saúde e à recuperação do animal (Burdick et al., 2011).

454 A resposta do cortisol, após a administração de LPS, foi diminuída no tratamento com  
455 emulsão lipídica exógena em comparação com os tratamentos controle e dextrose. Isso sugere

456 que as maiores concentrações de cortisol, antes da administração de LPS, atenuaram a resposta  
457 do cortisol estimulada por LPS (Sanchez et al., 2015).

458 Em vacas Lohuis et al. (1988a) e novilhas (Steiger et al., 1999) as concentrações  
459 plasmáticas de glicose, após a administração de endotoxina ou LPS, aumentaram inicialmente  
460 e depois diminuíram. Esses autores propuseram um aumento inicial na glicogenólise e na  
461 gliconeogênese, seguido por um aumento subsequente na utilização periférica de glicose e uma  
462 diminuição na gliconeogênese semelhante ao relatado para outras espécies. O aumento inicial  
463 na liberação hepática de glicose foi, provavelmente, o resultado do aumento da glicogenólise;  
464 enquanto o aumento sustentado da produção de glicose foi proveniente da gliconeogênese após  
465 a depleção do glicogênio hepático (Waldron et al., 2003). Gomez et al. (2019) destacam o  
466 potencial do LPS na patogênese de distúrbios metabólicos, como a hiperlactatemia e a  
467 hipoglicemia em bezerros diarréicos. Além disso, eles observaram as concentrações plasmáticas  
468 de LPS maiores em bezerros com diarreia e nos animais não sobreviventes, quando comparados  
469 aos animais saudáveis.

470

#### 471 **1.2.5. Alterações cardíacas induzida por LPS**

472

473 A bactéria gram-negativa *E. coli* causa infecção septicêmica e oportunista em bezerros  
474 neonatos. A septicemia causada por *E. coli* ocorre mais comumente de 1 a 14 dias de idade. O  
475 início da doença tende a ocorrer mais cedo nesse período, quando os bezerros são expostos a  
476 números elevados de *E. coli* logo após o nascimento, isto é, na maternidade. A transferência  
477 deficiente ou inexistente de imunoglobulinas passivas para o bezerro predispõe e acelera o  
478 aparecimento da doença (Peek et al., 2018).

479 Há fortes evidências de que a diarreia predispõe bezerros recém-nascidos à bacteremia.  
480 A diarreia em recém-nascidos pode estar associada à estase intestinal, hipoperfusão causada por  
481 hipovolemia, diminuição pH intestinal e inflamação, o que pode levar à falha da barreira  
482 mucosa. A falha da barreira intestinal pode facilitar a translocação de bactérias intestinais e da  
483 endotoxina na circulação sistêmica (Peek et al., 2018).

484 As bactérias Gram - envolvidas na sepse podem levar a disfunções múltiplas de órgãos,  
485 incluindo insuficiência cardíaca e arritmias (Kakihana et al., 2016; Yücel et al., 2017). O  
486 receptor TLR4, é amplamente expresso no corpo, incluindo cardiomiócitos (Tavener et al.,  
487 2004). O LPS se associa ao seu receptor TLR4 por meio da proteína CD14 de ligação ao LPS  
488 e, posteriormente, resulta na produção de citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18,

489 que pode perturbar diretamente a função cardíaca (Zhang, J. et al., 2009). Portanto, a resposta  
490 inflamatória inata pode ser evocada em cardiomiócitos pelo LPS, essa que poderia ser a razão  
491 para o fato de disfunções cardíacas terem sido frequentemente observadas em pacientes  
492 humanos com sepse e nos animais desafiados com LPS (Parker & Watkins, 2001).

493 O LPS é um indutor do processo inflamatório frequentemente usado como um insulto  
494 celular para induzir danos em modelos animais de doenças cardiovasculares. O envolvimento  
495 cardíaco piora o quadro de sepse, que, se grave, pode levar à morte. Estudos em níveis celulares,  
496 estudos cardíacos isolados, modelos animais *in vivo* e estudos humanos observaram a  
497 diminuição da contratilidade e a complacência miocárdica prejudicada, como os principais  
498 fatores que causam disfunção miocárdica na sepse (Martin et al., 2019).

499 Iwase et al. (2001), ao induzirem a endotoxemia com LPS (2 mg/kg) derivado de  
500 *Klebsiella pneumoniae*, em ratos machos Wistar, de oito e nove semanas, observaram o  
501 desenvolvimento imediato de hipotensão progressiva, com resposta hipotensora máxima de 10  
502 minutos após a infusão de LPS, além de alterações funcionais e estruturais do ventrículo  
503 esquerdo. De acordo com os autores, o aumento acentuado na espessura da parede do ventrículo  
504 esquerdo pode ser atribuído à congestão dos capilares e ao edema desse miocárdio.

505 Os cardiomiócitos, derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos  
506 (hiPSC-CMs), tratados com LPS apresentaram um prolongamento do potencial de ação, que  
507 pode ser arritmogênico, o que possivelmente explica as taquiarritmias observadas em modelos  
508 inflamatórios de animais ou em pacientes com sepse (Yücel et al., 2017). Pacientes humanos  
509 em choque séptico apresentam frequentemente arritmias supraventriculares e fibrilação atrial  
510 (Martin et al., 2019). Aoki et al. (2012) induziram um modelo de endotoxina com LPS (ip; 300  
511  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) em porquinhos-da-índia pesando 200–350 g, em que resultou em taquiarritmias  
512 atriais.

513 A instabilidade hemodinâmica foi observada em bezerros anestesiados, com 4 a 10 dias  
514 de idade, desafiados com endotoxina por via endovenosa, na dose de 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (O55:B5)  
515 (Constable et al., 1991). Em humanos infecções grave por bactérias Gram-negativas, como a  
516 sepse, pode levar a disfunções de múltiplos órgãos, incluindo insuficiência cardíaca e arritmias  
517 (Kakihana et al., 2016).

518 Plessers et al. (2015) observaram que, ao necropsiar um bezerro do grupo experimental  
519 induzido experimentalmente com *bolus* de 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS, foram apresentados dano alveolar  
520 difuso agudo e alterações compensatórias do miocárdio, as quais, mesmo sendo indicativas de  
521 lesão anterior, poderiam ter aumentado a sensibilidade ao LPS. Mais especificamente, as lesões

522 pulmonares incluíam congestão geral e edema, hemorragias múltiplas, enfisema alveolar  
523 multifocal e formação de membrana hialina. Além disso, observaram que dois bezerros (2/9)  
524 do estudo desenvolveram desconforto respiratório grave e hipoxemia.

525 Portanto observa-se que os modelos de desafio LPS em bovinos, demonstraram ser  
526 modelos seguros, de fácil execução e reprodutibilidade por apresentar um quadro inflamatório  
527 agudo de curta duração. Desta forma, estas pesquisas podem ser utilizadas para a compreensão  
528 de quadros de inflamação sistêmica por LPS (Carroll et al., 2009), podendo ser utilizado para  
529 interpretar as fases iniciais do comportamento doentio (Borderas et al., 2008; Plessers et al.,  
530 2015), o efeito das propriedades imunomoduladoras de anti-inflamatórios não esteroidais  
531 (Plessers et al., 2016), esteroidais (Plessers et al., 2015) e antimicrobianos (Plessers et al., 2015;  
532 Plessers et al., 2016) e assim contribuir para para o desenvolvimento de melhores estratégias de  
533 tratamento, com ênfase no bem-estar animal.

534

#### 535 **Referências**

536

537 Abraham E, Kaneko DJ, Shenkar R. Effects of endogenous and exogenous catecholamines on  
538 LPS-induced neutrophil trafficking and activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*  
539 1999;276(1 20-1):1–8. DOI: 10.1152/ajplung.1999.276.1.L1

540

541 Aoki Y, Hatakeyama N, Yamamoto S, Kinoshita H, Matsuda N, Hattori Y, Yamazaki M. Role  
542 of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs. *Br J Pharmacol.*  
543 2012;166(1):390–400. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01769.x

544

545 Asti C, Ruggieri V, Porzio S, Chiusaroli R, Melillo G, Caselli GF. Lipopolysaccharide-induced  
546 lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung  
547 damage. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13(2):61–9. DOI: 10.1006/pupt.2000.0231

548

549 Ballou MA, Cruz GD, Pittroff W, Keisler DH, DePters EJ. Modifying the acute phase response  
550 of Jersey calves by supplementing milk replacer with omega-3 fatty acids from fish oil. *J Dairy*  
551 *Sci.* 2008;91(9):3478–87. DOI: 10.3168/jds.2008-1016

552

553 Bergman ZR, Kiberenge RK, Bianco R, Beilman G, Brophy CM, Hocking KM, Alvis BD, Wise  
554 ES. The Effect of Fluid Pre-loading on Vital Signs and Hemodynamic Parameters in a Porcine

- 555 Model of Lipopolysaccharide-Induced Endotoxemia. *Cureus*. 2023;l(8). DOI:  
556 10.7759/cureus.43103  
557
- 558 Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. 2018;8(1).  
559 DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018  
560
- 561 Boosman R, Niewold TA, Mutsaers CW, Gruys E. Serum amyloid A concentrations in cows  
562 given endotoxin as an acute-phase stimulant. *Am J Vet Res*. 1989;50(10):1690–4. PMID:  
563 2508514.  
564
- 565 Borderas TF, De Passillé AM, Rushen J. Behavior of dairy calves after a low dose of bacterial  
566 endotoxin. *J Anim Sci*. 2008;86(11):2920–7. DOI: 10.2527/jas.2008-0926  
567
- 568 Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the  
569 stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(10):854–65. DOI: 10.1038/nrd1854  
570
- 571 Burdick NC, Carroll JA, Hulbert LE, Dailey JW, Ballou MA, Randel RD, Willard ST, Vann  
572 RC, Welsh TH. Temperament influences endotoxin-induced changes in rectal temperature,  
573 sickness behavior, and plasma epinephrine concentrations in bulls. *Innate Immun*.  
574 2011;17(4):355–64. DOI: 10.1177/1753425910365296  
575
- 576 Carroll JA, Reuter RR, Chase CC, Coleman SW, Riley DG, Spiers DE, Arthington JD, Galyean  
577 ML. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose  
578 lipopolysaccharide challenge. *Innate Immun*. 2009a;15(2):81–9.  
579
- 580 Carroll JA, Reuter RR, Chase CC, Coleman SW, Riley DG, Spiers DE, Arthington JD, Galyean  
581 ML. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose  
582 lipopolysaccharide challenge. *Innate Immun*. 2009b;15(2):81–9. 0.1177/1753425909102876  
583
- 584 Cavaillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon*.  
585 2018;149:45–53. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.03.001  
586

- 587 Constable PD, Schmall LM, Muir WW, Hoffsis GF. Respiratory, renal, hematologic, and serum,  
588 biochemical effects of hypertonic saline solution in endotoxemic calves. *Am J Vet Res.*  
589 1991;52(7):990–8. DOI: 10.1105/amjvetres.52.7.990  
590
- 591 Coskun A, Sen I. *Journal of Veterinary Sciences. Eurasian Journal of Veterinary Sciences.*  
592 2012;4:194–8.  
593
- 594 Deitch EA. *Animal Models Of Sepsis And Shock: A Review And Lessons Learned. Shock.*  
595 1998;01:1–11. DOI: 10.1097/00024382-199801000-00001  
596
- 597 Dickson MJ, Kvidera SK, Horst EA, Wiley CE, Mayorga EJ, Ydstie J, Perry GA, Baumgard  
598 LH, Keating AF. Impacts of chronic and increasing lipopolysaccharide exposure on production  
599 and reproductive parameters in lactating Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 2019;102(4):3569–  
600 83. DOI: 10.3168/jds.2018-15796  
601
- 602 Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: The immune  
603 system feels the heat. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):335–49. DOI: 10.1038/nri3843  
604
- 605 Gomez DE, Rodriguez-Lecompte JC, Lofstedt J, Arroyo LG, Nino-Fong R, McClure JT.  
606 Detection of endotoxin in plasma of hospitalized diarrheic calves. *J Vet Emerg Crit Care (San*  
607 *Antonio).* 2019 Mar;29(2):166-172. doi: 10.1111/vec.12815. Epub 2019 Feb 27. PMID:  
608 30810269. DOI: 10.1111/vec.12815  
609
- 610 Hughes HD, Carroll JA, Sanchez NCB, Richeson JT. Natural variations in the stress and acute  
611 phase responses of cattle. *Innate Immun.* 2014;20(8):888–96. DOI:  
612 10.1177/1753425913508993  
613
- 614 Iwase M, Yokota M, Kitaichi K, Wang L, Takagi K, Nagasaka T, Izawa H, Hasegawa T. Cardiac  
615 functional and structural alterations induced by endotoxin in rats: importance of platelet-  
616 activating factor. *Crit Care Med.* 2001;29(3):609–17. DOI: 10.1097/00003246-200103000-  
617 00025  
618



- 619 Jacobsen S, Andersen PH, Toelboell T, Heegaard PMH. Dose dependency and individual  
620 variability of the lipopolysaccharide- induced bovine acute phase protein response. *J Dairy Sci.*  
621 2004;87(10):3330–9. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73469-4  
622
- 623 Jing L, Zhang R, Liu Y, Zhu W, Mao S. Intravenous lipopolysaccharide challenge alters ruminal  
624 bacterial microbiota and disrupts ruminal metabolism in dairy cattle. *British Journal of*  
625 *Nutrition.* 2014;112(2):170–82. DOI: 10.1017/S000711451400066X  
626
- 627 Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. Ultracapacitors: Some perspectives  
628 on Technology, Modelling and Applications - Maxwell Technology. *Nat Immunology.*  
629 2008;9(4):361–8. DOI: 10.1038/ni1569  
630
- 631 Kakihana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T. Sepsis-induced myocardial  
632 dysfunction: Pathophysiology and management. *J Intensive Care.* 2016;4(1):1–10. DOI:  
633 10.1186/s40560-016-0148-1  
634
- 635 Kalynych S, Morona R, Cygler M. Progress in understanding the assembly process of bacterial  
636 O-antigen. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):1048–65. DOI: 10.1111/1574-6976.12070  
637
- 638 Klein G, Raina S. Regulated control of the assembly and diversity of lps by noncoding sRNAs.  
639 *Biomed Res Int.* 2015;2015. DOI: 10.1155/2015/153561  
640
- 641 Kreimeier U, Brueckner UB, Gerspach S, Veitinger K, Messmer K. A porcine model of  
642 hyperdynamic endotoxemia: Pattern of respiratory, macrocirculatory, and regional blood flow  
643 changes. *Journal of Investigative Surgery.* 1993;6(2):143–56. DOI:  
644 10.3109/08941939309141605  
645
- 646 Lippolis KD, Cooke RF, Schubach KM, Marques RS, Bohnert DW. Effects of intravenous  
647 lipopolysaccharide administration on feed intake, ruminal forage degradability, and liquid  
648 parameters and physiological responses in beef cattle. *J Anim Sci.* 2017;95(7):2859–70. DOI:  
649 10.2527/jas.2017.1502
- 650 Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, van Miert AS. Pathophysiological effects of  
651 endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the

- 652 effect of repeated administration. *Vet Q.* 1988a;10(2):109–16. DOI:  
653 10.1080/01652176.1988.9694157  
654
- 655 Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, van Miert AS. Pathophysiological effects of  
656 endotoxins in ruminants. 2. Metabolic aspects. *Vet Q.* 1988b;10(2):117–25. DOI:  
657 10.1080/01652176.1988.9694158  
658
- 659 Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.*  
660 2008;42(2):145–51. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006  
661
- 662 Martin L, Derwall M, Al Zoubi S, Zechendorf E, Reuter DA, Thiemermann C, Schuerholz T.  
663 The Septic Heart: Current Understanding of Molecular Mechanisms and Clinical Implications.  
664 *Chest.* 2019;155(2):427–37. DOI: 10.1016/j.chest.2018.08.1037  
665
- 666 Michaeli B, Martinez A, Revelly J, Cayeux M, Chioléro RL. Effects of endotoxin on lactate  
667 metabolism in humans. *Crit Care.* 2012;16(4):R139. DOI: 10.1186/cc11444  
668
- 669 Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited.  
670 *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2003;67(4):593–656. DOI:  
671 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003  
672
- 673 Opgenorth J, Abeyta MA, Goetz BM, Rodriguez-Jimenez S, Freestone AD, Rhoads RP,  
674 McMillan RP, McGill JL, Baumgard LH. Intramammary lipopolysaccharide challenge in early-  
675 versus mid-lactation dairy cattle: Immune, production, and metabolic responses. *J Dairy Sci.*  
676 2024;107(8):6252–67. DOI: 10.3168/jds.2023-24488  
677
- 678 Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of Gram-negative sepsis. 2001;22–31. DOI:  
679 10.1046/j.1365-2168.2001.01632.x  
680
- 681 Peek SF, Mcguirk SM, Sweeney RW, Cummings KJ. Infectious Diseases of the Gastrointestinal  
682 Tract. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle.* 2018. p. 249–356.  
683

- 684 Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in  
685 veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35:163–87. DOI: 10.1051/vetres:2004002  
686
- 687 Plessers E., Watteyn A, Wyns H, Pardon B, De Backer P, Croubels S. Study of the  
688 immunomodulatory properties of gamithromycin and dexamethasone in a lipopolysaccharide  
689 inflammation model in calves. *Res Vet Sci.* 2015;103:218–23. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.10.014  
690
- 691 Plessers Elke, Wyns H, Watteyn A, Pardon B, De Backer P, Croubels S. Characterization of an  
692 intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase  
693 response. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163(1–2):46–56. DOI:  
694 10.1016/j.vetimm.2014.11.005  
695
- 696 Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid a modification systems in gram-  
697 negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:295–329. DOI:  
698 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803  
699
- 700 Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen  
701 A, Trauner M, Singer M, Bauer M. Mechanisms and functional consequences of liver failure  
702 substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver International.*  
703 2013;33(2):283–93. DOI: 10.1111/liv.12012  
704
- 705 Remick DG, Newcomb david E, Bolgos GL, Call Dr. Comparision Of The Mortality And  
706 Inflammatory Response Of Two Models Of Sepsis: Lipopolysaccharide Vs. Cecal Ligation And  
707 Puncture. *Shock.* 2000;13:110–6. DOI: 10.1097/00024382-200013020-00004  
708
- 709 Sanchez NCB, Carroll JA, Donaldson JR, Buntyn JO, Schmidt TB. Exogenous administration  
710 of lipids to steers alters aspects of the innate immune response to endotoxin challenge. *Innate*  
711 *Immun.* 2015;21(5):512–22. DOI: 10.1177/1753425914552741  
712
- 712 Silhavy TJ;, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives*  
713 *Biology.* 2010;5:1–17. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414  
714

- 715 Steiger M, Senn M, Altreuther G, Werling D, Sutter F, Kreuzer M, Langhans W. Effect of a  
716 prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers. *J*  
717 *Anim Sci.* 1999;77(9):2523–32. DOI: 10.2527/1999.7792523x
- 718
- 719 Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Lyle L. ML, Mohr AM, Efron PA. Murine models of sepsis  
720 and trauma: Can We bridge the gap? *ILAR J.* 2017;58(1):90–105. DOI: 10.1093/ilar/ilx007
- 721
- 722 Tan S, Long Z, Hou X, Lin Y, Xu J, You X, Wang T, Zhang Y. H2 protects against  
723 lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction via blocking TLR4-mediated cytokines  
724 expression. *Front Pharmacol.* 2019;10(JULY). DOI: 10.3389/fphar.2019.00865
- 725
- 726 Tavener SA, Long EM, Robbins SM, McRae KM, Van Remmen H, Kubes P. Immune cell Toll-  
727 like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res.*  
728 2004;95(7):700–7. DOI: 10.1161/01.RES.0000144175.70140.8c
- 729
- 730 TIZARD, I R. Imunidade Inata: Mediadores Próinflamatórios e Antimicrobianos. In: TIZARD,  
731 I R (Org.). . *Imunologia Veterinária.* 9. ed. São Paulo-SP: Elsevier, 2019. p. 70–84. 978-85-352-  
732 7303-8.
- 733
- 734 Waggoner JW, Löest CA, Turner JL, Mathis CP, Hallford DM. Effects of dietary protein and  
735 bacterial lipopolysaccharide infusion on nitrogen metabolism and hormonal responses of  
736 growing beef steers. *J Anim Sci.* 2009;87(11):3656–68. DOI: 10.2527/jas.2009-2011
- 737
- 738 Waldron MR, Nishida T, Nonnecke BJ, Overton TR. Effect of lipopolysaccharide on indices of  
739 peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. *J Dairy Sci.* 2003;86(11):3447–59. DOI:  
740 10.3168/jds.S0022-0302(03)73949-6
- 741
- 742 Wang L, Wang Q, Reeves PR. The variation of O antigens in gram-negative bacteria. *Subcell*  
743 *Biochem.* 2010;53:123–52. DOI: 10.1007/978-90-481-9078-2\_6
- 744 Wyns H, Meyer E, Plessers E, Watteyn A, van Bergen T, Schauvliege S, De Baere S, Devreese  
745 M, De Backer P, Croubels S. Modulation by gamithromycin and ketoprofen of in vitro and in  
746 vivo porcine lipopolysaccharide-induced inflammation. *Vet Immunol Immunopathol.*  
747 2015;168(3–4):211–22. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.09.014

748

749 Yücel G, Zhao Z, El-Battrawy I, Lan H, Lang S, Li X, Buljubasic F, Zimmermann WH,  
750 Cyganek L, Utikal J, Ravens U, Wieland T, Borggreffe M, Zhou XB, Akin I.  
751 Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in  
752 human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13. DOI:  
753 10.1038/s41598-017-03147-4

754

755 Zhang G, Meredith T, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative  
756 bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2014;16(6):779–85. DOI: 10.1016/j.mib.2013.09.007

757

758 Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ.  
759 Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res.*  
760 2009;104(4):e30-41. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.108.192237

761 **CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UM MODELO DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA**  
762 **INDUZIDO POR VIA ENDOVENOSA COM LIPOPOLISSACARÍDEO DERIVADO DE**  
763 ***ESCHERICHIA COLI* EM BEZERROS MESTIÇOS**

764  
765 **Artigo nas normas para publicação na revista**  
766 **Tropical Animal Health and Production**  
767

768 Beatryz Fonseca da Silva<sup>1,2,3</sup>, Layane Queiroz Magalhães<sup>1</sup>, Vinícius de Moraes Barbosa, Oglênia Pereira  
769 Ramos, João Paulo Elsen Saut<sup>1,4\*</sup>

770 <sup>1</sup>Large Animal Health Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia,  
771 Minas Gerais, Brazil.

772 <sup>2</sup>Divisão de Apoio as Atividades de Campo, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais,  
773 Brasil.

774 <sup>3</sup>Clínica Veterinária Universitária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Norte  
775 do Tocantins, Tocantins, Brasil

776 <sup>4</sup>Universidade de Uberaba - UNIUBE, Minas Gerais, Brasil.

777  
778 \* **Corresponding author:**

779 *Email address:* [jpsaut.vet@gmail.com](mailto:jpsaut.vet@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-0860-5413>  
780

781 **Resumo**

782 O objetivo deste estudo foi avaliar e validar o modelo da ativação imune aguda em bezerros mestiços (Girx  
783 Holandês), de três a oito meses, criados em região de clima tropical, induzida pela administração intravenosa de  
784 lipopolissacarídeos (LPS). Para isso, o estudo foi dividido em dois grupos experimentais: grupo controle (n.º 4) e  
785 grupo desafio-LPS (n.º 7). Os animais receberam *bolus* intravenoso (iv.) com solução salina ou com LPS derivado  
786 de *Escherichia coli* (0111:B4), na dose de 0,5 µg de LPS/kg de peso corporal. Foram realizados os seguintes  
787 exames: exame clínico geral, eletrocardiograma, aferição da pressão arterial indireta e coletas de amostras de  
788 sangue venoso para análise de hemograma completo, glicemia, lactato venoso e citocinas. Na resposta sistêmica  
789 ao LPS, houve diferenças para os sinais clínicos de taquipneia (1,4 hora e 6 horas) e taquicardia (3,4 horas e 6  
790 horas) após o desafio, com recuperação dos animais dentro de 72 horas. A administração de LPS reduziu a  
791 concentração de glicose 8 horas após o desafio e aumentou as concentrações de lactato venoso. Além disso, o  
792 desafio aumentou significativamente as concentrações plasmáticas da interleucina IL1β, com picos de 1,5 hora e  
793 3 horas e interleucina 6 com 1; 1,5; 3; 4; 6 e 12 horas. Na avaliação do ritmo cardíaca um animal apresentou  
794 arritmia ventricular 6 horas após o LPS, e 75% dos animais desafiados com LPS apresentaram 1 hora após a  
795 administração bloqueio atrioventricular de segundo grau. O presente modelo LPS em bezerros mestiços, mantidos

796 em condições de clima tropical, apresentou alterações clínicas e inflamatórias relacionadas à endotoxemia aguda  
797 induzida por LPS, além de uma importante informação sobre o efeito da endotoxemia nos distúrbios de ritmo e  
798 condução cardíaca, sendo este trabalho um dos primeiros a mostrar os resultados em bezerros mestiços desafiados  
799 com LPS.

800

801 **Palavras-chave:** LPS. Endotoxemia. Bezerros. *E. coli*. Eletrocardiograma.

802

## 803 **2.1. Introdução**

804

805 O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente estrutural importante da membrana externa de bactérias  
806 Gram-negativas (Lohuis et al., 1988) como a *Escherichia coli* (*E. coli*). O LPS é constituído de um lipídio A, um  
807 oligossacarídeo central e uma cadeia lateral O (Hang et al., 2013). O lipídio A, a porção lipídica do LPS,  
808 desempenha um papel central na ativação do sistema imune inato para as doenças causadas por bactérias Gram-  
809 negativas, sendo um potente estimulador da imunidade inata em mamíferos e considerado o principal Padrão  
810 Molecular Associado a Patógeno (PAMP) do LPS (Lu et al., 2008).

811 A endotoxemia causada por bactérias Gram-negativas é um quadro importante de muitas doenças  
812 pecuárias e, embora um desafio isolado com LPS não possa replicar fielmente infecções sépticas naturais, as quais  
813 podem ser exacerbadas por efeitos ambientais adicionais, alguns efeitos locais da inflamação aguda podem ser  
814 estudados com o uso de modelos de indução de resposta inflamatória aguda (Smock et al., 2023).

815 Esses modelos experimentais de desafio imunológico, como o desafio com LPS, são utilizados em estudos  
816 para produzir uma resposta imune robusta que mimetiza as doenças inflamatórias (Lohuis et al., 1988; Smock et  
817 al., 2023), possibilitando o estudo do efeito da endotoxemia nos sistemas imunológico, de crescimento e de estresse  
818 (Waldron et al., 2003); metabólico (Kvidera et al., 2017; Horst et al., 2019) e reprodutivo bovino (Dickson et al.,  
819 2019). A aplicação desses métodos contribui para o maior entendimento da resposta bovina às doenças  
820 inflamatórias (Smock et al., 2023).

821 Plessers et al. (2015) desenvolveram um modelo de inflamação sistêmica aguda após a administração  
822 intravenosa de LPS (0,5 µg/Kg PV) em bezerros holandeses de 4 semanas de idade, criados em região de clima  
823 temperado, descrevendo alterações nas respostas clínicas e inflamatórias, como o aumento das concentrações das  
824 proteínas de fase aguda (PFA) amiloide sérica A e haptoglobina e da interleucina 6 (IL 6) e fator de necrose  
825 tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

826 Carroll et al. (2009) também desenvolveram um modelo experimental que induziu uma resposta de fase  
827 aguda pronunciada em novilhos Angus, com a administração de bolus de LPS (2,5µg/Kg/PV). Ressalta-se ainda  
828 que a resposta dos animais ao LPS pode depender do sorotipo e da dose do LPS (Jacobsen et al., 2004).

829 Sabe-se que a formação e a propagação do impulso cardíaco podem ser afetadas por anormalidades  
830 metabólicas, eletrolíticas (Rezakhani et al., 2004) e sepse (Kakihana et al., 2016). O eletrocardiograma é uma  
831 importante ferramenta diagnóstica não invasiva de baixo custo, que pode ser usada para determinar a frequência  
832 cardíaca, o ritmo cardíaco e os distúrbios de condução. O maior interesse da eletrocardiografia bovina é, portanto,  
833 o diagnóstico preciso da arritmia (Rezakhani et al., 2004; Cicogna et al., 2022), cuja indicação envolve  
834 principalmente situações de irregularidades da frequência cardíaca (bradicardia ou taquicardia), dispneia e  
835 hipoxemia.

836 Plessers et al. (2015) observaram, em bezerros holandeses desafiados com LPS, sinais de dispneia e  
837 taquipneia 30 minutos após o LPS, assim como Gilbert et al. (2024), em bezerros holandeses de aproximadamente  
838 10 semanas, e Carroll et al. (2009), em novilhos Angus. Enquanto isso, picos de taquipneia foram relatados nos  
839 bezerros leiteiros de 20 semanas (Borderas et al., 2008) e em vacas leiteiras (Waldron et al., 2003; Jacobsen et al.,  
840 2004) 3 horas após a administração do LPS.

841 Além disso, estudos anteriores relataram também, em resposta ao LPS, alterações como taquicardia  
842 (Carroll et al., 2009; Plessers et al., 2015), febre e depressão do nível de consciência (Borderas et al., 2008; Carroll  
843 et al., 2009; Plessers et al., 2015).

844 Diante disso, conduziu-se um estudo com o objetivo de caracterizar e validar o efeito da ativação imune  
845 aguda (ou endotoxemia aguda) induzida pela administração intravenosa de LPS em bezerros mestiços (Gir x  
846 Holandês), criados em região de clima tropical. A hipótese deste estudo é que a ativação imune desencadearia uma  
847 resposta de fase aguda sistêmica similar aos parâmetros indicativos de ativação imunológica observados em  
848 bezerros holandeses em clima temperado e que a endotoxemia induzida resultaria na disfunção cardíaca, com  
849 alterações no ritmo e na condução cardíaca.

850

## 851 **2.2. Material e métodos**

852

### 853 **2.2.1. Animais e local de estudo**

854 O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais PEC AGRO (009/2021).  
855 O estudo prospectivo foi realizado no município de Perdizes (Latitude: 19° 21' 10" S e Longitude: 47° 17' 34" W),  
856 Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2021 a março de 2022.



857 No total, foram incluídos 11 bezerros mestiços (Gir x Holandês), sendo 6 fêmeas e 5 machos, com idade  
858 média de  $5,5 \pm 1,6$  meses (3 a 8 meses) e peso médio de  $116,8 \pm 28,7$  kg (73 a 184 kg). Estes animais não foram  
859 tratados com medicamentos farmacológicos sistêmicos (anti-inflamatórios e antimicrobianos) por pelo menos 30  
860 dias antes da seleção, que ocorreu 5 dias (D -5) antes do início do estudo. Os bezerros foram considerados  
861 saudáveis com base na avaliação clínica proposta (Terra and Reynolds, 2014). Os animais foram mantidos durante  
862 o estudo em lotes coletivos, sem contato com outros animais do rebanho, em áreas de piquete com sombreamento  
863 natural e alimentados com silagem de milho, ração, sal mineral e água *ad libitum*.

864

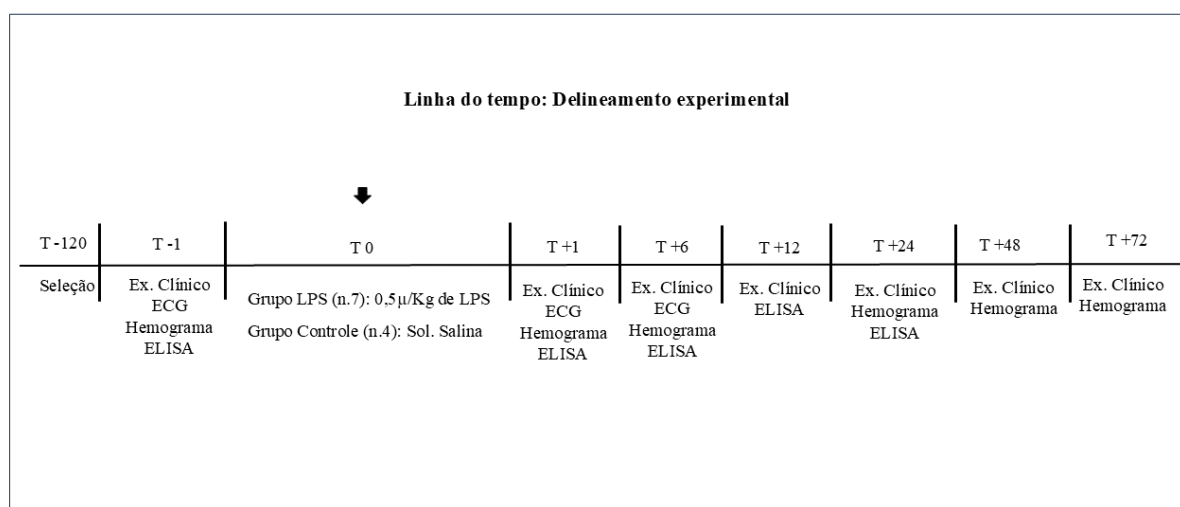
### 865 **2.2.2. Delineamento experimental e coleta das amostras**

866 Os animais selecionados para o estudo foram randomizados quanto ao sexo, peso e idade e divididos  
867 aleatoriamente em dois grupos experimentais, grupo controle negativo (solução salina) e grupo desafiado com LPS  
868 (desafio-LPS).

869 O delineamento experimental está apresentado na figura 1. No dia da indução (D 0), foram coletadas  
870 amostras de sangue venoso uma hora antes (T -1h) do tratamento com solução salina ou LPS dos grupos  
871 experimentais, para servir de referência para a análise do hemograma completo, lactato venoso, glicemia,  
872 interleucinas 6 (IL6) e 1 beta (IL1 $\beta$ ), além da mensuração da pressão arterial indireta e eletrocardiograma. Após o  
873 intervalo de uma hora, no momento (T 0h), os animais do grupo tratado com Lipopolissacarídeo (desafio-LPS)  
874 receberam por via intravenosa, em dose única feita em *bolus*, 0,5  $\mu$ g/Kg de LPS derivado de *E. coli* (*E. coli*  
875 0111:B4, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), diluído em 20 ml de solução salina. O grupo controle recebeu  
876 volume semelhante de solução salina (20 ml de NaCl 0,9 %), por via intravenosa em dose única (Plessers et al.,  
877 2015).

878 Foram coletadas amostras de sangue venoso para análise do hemograma completo, lactato venoso,  
879 glicemia e citocinas IL1 $\beta$  e IL6: a) hemograma completo, momentos T -1h, 24h (T +24h), 48h (T +48h) e 72h (T  
880 +72h) após a indução experimental; b) lactato venoso, momentos T -1h, 1h (T +1h), 2h (T +2h), 3h (T +3h), 4h (T  
881 +4h) e 6h (T +6h) após a indução experimental; c) glicemia nos momentos T -1h, T +1h, T +2h, T +3h, T +4h e T  
882 +6h, 8h (T +8h), 12h (T +12h) e 24h (T +24h) após a indução; d) ELISA (IL1 $\beta$  e IL6) nos momentos T -1h, T  
883 +1h, 1,5h (T +1.5h), T +2h, T +3h, T +4h, T +6h, T +12 e T +24h após a indução.

884 Os animais foram avaliados clinicamente no momento de seleção (D-5, T -120h) e nos momentos T -1h,  
885 T +1h, T +2h, T +3h, T +4h, T +6h, T +8h, T +12h, T +24h, 36h (T +36h), 48h (T +48h) e 72h (T +72h) após a  
886 indução. Durante as primeiras seis horas foram realizadas aferições da pressão arterial indireta (Método Doppler)  
887 e eletrocardiograma (ECG) (Figura 1).



888

889 **Figura 1:** Delineamento experimental. Os momentos antes e após o desafio são apresentados em horas. A seta  
 890 indica o momento da aplicação *bolus* intravenoso de 0,5 μg/Kg de LPS derivados de *E. coli* (0111:B4) e solução  
 891 salina realizada nos bezerros mestiços em clima tropical.

892

### 893 2.2.3. Avaliação clínica e coleta de sangue

894 A avaliação clínica foi realizada por meio da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR),  
 895 inspeção de mucosas (oral, ocular e peniana/vulvar), tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura retal (T  
 896 °C), grau de desidratação (%) e nível de consciência (Terra e Reynolds, 2014). Os animais foram pesados nos  
 897 momentos T -120h, T -1h e T +72h.

898 Três amostras de sangue venoso foram colhidas na veia jugular externa (direita ou esquerda) em cada um  
 899 dos momentos selecionados, utilizando sistema de vácuo: a) tubo contendo EDTA K3 (BD Vacutainer, Brasil)  
 900 para hemograma completo (eritrograma e leucograma) b) tubo contendo gel separador e ativador de coágulos (BD  
 901 Vacutainer, Brasil) para análise da concentração de citocinas; c) tubo contendo fluoreto de sódio (NaF) e EDTA-  
 902 K3 para dosagem de lactato venoso.

903 No laboratório as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação à 720g, durante cinco minutos,  
 904 para separação do soro ou plasma (a depender do tubo e anticoagulante); em seguida o volume separado foi  
 905 pipetado e dividido em dois tubos tipo *ependorf* (microtubos), sendo uma prova e uma contraprova, e foram  
 906 armazenados em temperatura entre -20° C e -80° C, respectivamente, até a realização final das análises.

907

#### 908 **2.2.4. Medição da pressão arterial indireta**

909 A pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) foram medidas indiretamente (não  
910 invasiva) por meio da técnica de fluxo ultrassônico Doppler (Doppler Vascular Veterinário DV 610 V -  
911 MEDMEGA). Com o animal em estação, posicionou-se o manguito na porção cranial da cauda e foi escolhido um  
912 tamanho de manguito com largura aproximada de 40% da circunferência da cauda (Geddes et al., 1980).

913 A descrição da técnica está apresentada a seguir. No local de colocação da sonda ou transdutor, sobre a  
914 artéria coccígea, foi aplicado gel de acoplamento. Ela (sonda ou manguito) foi posicionada e testado cranialmente  
915 a manguito para receber um sinal sonoro claro do dispositivo Doppler e sempre retestado antes de cada medição  
916 para garantir a qualidade do sinal. Uma vez identificado o sinal sonoro pelo transdutor, este foi mantido/fixado  
917 sobre o vaso, pelo período da aferição. O manguito foi insuflado 40 mmHg acima do ponto onde o sinal de pulso  
918 não era mais audível e depois desinflado progressivamente. Quando o sinal de pulso voltou a ser audível, foi  
919 registrado como pressão arterial sistólica (PAS). A pressão sistólica foi determinada quando o sinal de pulso se  
920 tornou audível novamente, e a pressão diastólica quando os sinais audíveis, abruptamente, diminuíram ou  
921 alteraram o timbre, tornando-se abafados. O manguito foi completamente desinflado, entre cada medição. O  
922 operador usou fones de ouvido para todas as medições Doppler. Foram realizadas três medições consecutivas para  
923 a obtenção da média. E a hipotensão foi definida como PAS < 90 mmHg (Bourazak and Hofmeister, 2018).

924

#### 925 **2.2.5. Eletrocardiograma**

926 Os traçados do eletrocardiograma (ECG) (Monitor Veterinário Multiparamétrico - DL 1000 Touch  
927 Screen, PREVTECH®) foram registrados apenas quando os animais estavam parados e quietos na posição  
928 quadrupedal. O sistema de derivação utilizado foi o base – ápice, o eletrodo positivo da derivação I (esquerda) foi  
929 posicionado ao nível do 5º ou 6º espaço intercostal esquerdo, caudal ao olécrano, e o eletrodo negativo no sulco  
930 jugular no terço inferior do lado direito do pescoço. O 3º eletrodo foi fixado longe desses 2 eletrodos, na altura da  
931 ponta do ombro esquerdo (Rezakhani et al., 2004). Os traçados de ECG foram registrados a 25 mm/s com um  
932 ganho de 1mm/mV, por um período de três minutos. A frequência e o ritmo cardíaco, as durações e amplitudes  
933 das ondas P, QRS e T, bem como a duração do intervalo PR, intervalo QT e segmento ST foram então medidas e  
934 analisadas por meio do programa de software de análise de ECG (ECG Delta Vet7® v1.3.0.0).

935

#### 936 **2.3. Análise laboratorial**

937

938 **2.3.1. Hemograma, glicemia e lactato venoso**

939 O hemograma foi realizado no aparelho ABX Horiba®, sendo avaliada a contagem de hemácias (He),  
940 Hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM),  
941 concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de leucócitos totais e diferencial (neutrófilos  
942 segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos), além da contagem de  
943 plaquetas (PQT).

944 A concentração de glicose plasmática foi mensurada por meio de tiras teste Accu-check Active e leitura  
945 no Monitor Accu-check Active (Roche Diabetes Care Brasil Ltda). A concentração plasmática de lactato venoso  
946 foi realizada no analisador bioquímico automático PKL125®, com Kit comercial Labtest Diagnóstica®.

947

948 **2.3.2. ELISA**

949 As concentrações séricas de IL1 $\beta$  e IL6 foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante  
950 incluídas nos kits de ELISA específicos para cada citocina (Thermo Scientific® Bovine IL6 Reagent Kit number  
951 ESS0029; Rockford, US; Thermo Scientific® Bovine IL1 $\beta$  Reagent Kit number ESS0027; Rockford, USA).

952 A leitura da densidade óptica foi realizada nas absorvâncias de 450 e 550 nm, por meio do aparelho  
953 SpectraMax M2 / M2e 307 (Molecular Devices Corporation, San Jose, CA, USA), utilizando o programa  
954 SoftMax Pro Software (Molecular Devices Corporation). Após a leitura da densidade óptica, os resultados foram  
955 transferidos para planilha de Excel, onde os valores obtidos pela leitura de 550 nm foram subtraídos dos valores  
956 da leitura de 450 nm. Em seguida, os resultados obtidos foram lançados no programa MyAssays Analysis Software  
957 Solutions®, para análise e obtenção dos valores referentes à produção das interleucinas em pg/mL.

958

959 **2.3.3. Análise estatística**

960 Os dados foram tabulados, inicialmente, em planilhas do programa Microsoft Excel® (Microsoft Office  
961 365 Software, Redmond, WA, EUA). Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado  
962 o programa estatístico GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O fator animal foi  
963 considerado como unidade experimental. A análise descritiva foi apresentada em média, desvio-padrão e  
964 porcentagem. Os resultados da concentração sérica de IL1 $\beta$  e IL6 foram apresentados em porcentagem em relação  
965 à concentração basal, considerada a concentração encontrada antes do desafio (T -1h).

966 A decisão para o teste adequado a ser empregado na análise dos dados considerou o tipo de variável  
967 (quantitativa ou qualitativa) e a dependência entre os grupos. Foi realizada uma avaliação intergrupos (grupo

968 controle e tratado) e intragrupos em todos os momentos avaliados. Para as variáveis qualitativas e não-pareadas  
969 (teste intergrupos) utilizou-se o teste de Fisher ao nível de significância de 5%.

970 Para as variáveis quantitativas, inicialmente, avaliou-se a normalidade dos dados por meio do teste de  
971 Anderson Darling ou Kolmogorov-Smirnov ao nível de significância de 5%. Para comparar duas variáveis  
972 quantitativas não-pareadas (teste intergrupos) foi utilizado o teste T não-pareado para variáveis com distribuição  
973 normal (variáveis paramétricas) ou o teste de Mann-Whitney para variáveis com distribuição não-normal  
974 (variáveis não-paramétricas).

975 Para comparar mais de duas variáveis pareadas (teste intragrupo) foi utilizada a análise de variância de  
976 uma direção (one-way ANOVA) com pós-teste de Tukey para as variáveis com distribuição normal (variáveis  
977 paramétricas) e o teste de Friedman com pós-teste de comparação múltipla de Dunn's para as variáveis com  
978 distribuição não-normal (variáveis não-paramétricas). Todos os testes foram avaliados com nível de significância  
979 de 5% ( $P \leq 0,05$ ) e considerou-se tendência o valor de significância de 1% ( $P < 0,1$ ).

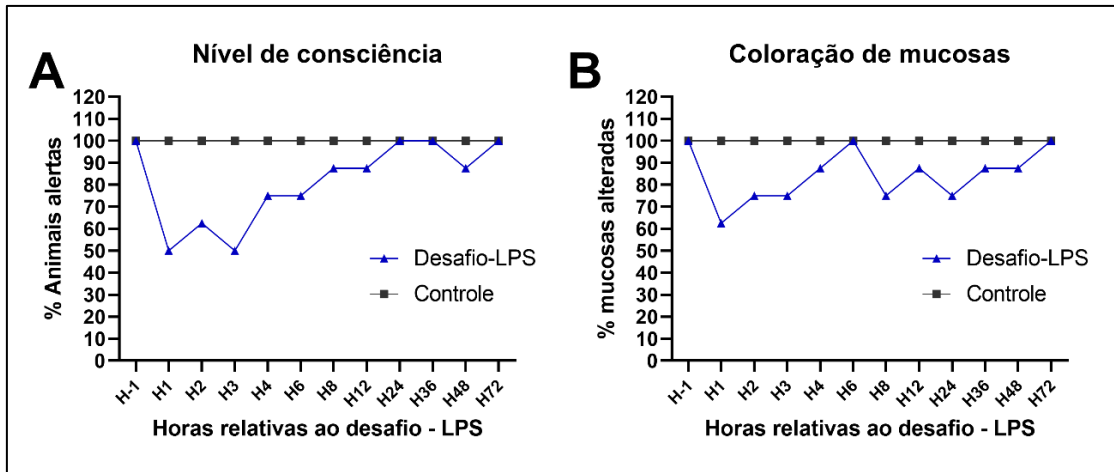
980

## 981 **2.4. Resultados**

982

### 983 **2.4.1. Exame clínico**

984 O efeito da indução com LPS no nível de consciência e coloração de mucosas está apresentado na Figura  
985 2. Observou-se que 50 % (4/8) dos animais do grupo desafio-LPS estavam apáticos nos momentos T +1h e +3h,  
986 37,5 % (3/8) em T +2h, sendo que a partir das 4 horas houve uma redução gradativa dos sinais de apatia até o T  
987 +12h, entretanto, não houve diferença entre os grupos experimentais (figura 2B). Também não ocorreu diferença  
988 entre os grupos experimentais em relação a coloração das mucosas (Figura 2A). A maior porcentagem de mucosas  
989 alteradas foi observada em T +1h (37,5 %). Apenas um bezerro apresentou desidratação leve (6 - 8 %), entre os  
990 momentos T +2h e T +8h. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações nas avaliações de nível de  
991 consciência, coloração de mucosas e percentual de desidratação durante o período de avaliação do estudo.



992

993 **Figura 2.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo - LPS intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4)  
 994 em bezerros mestiços, criados em clima tropical, no nível de consciência e coloração de mucosas.

995

996

997

998

999

1000

1001

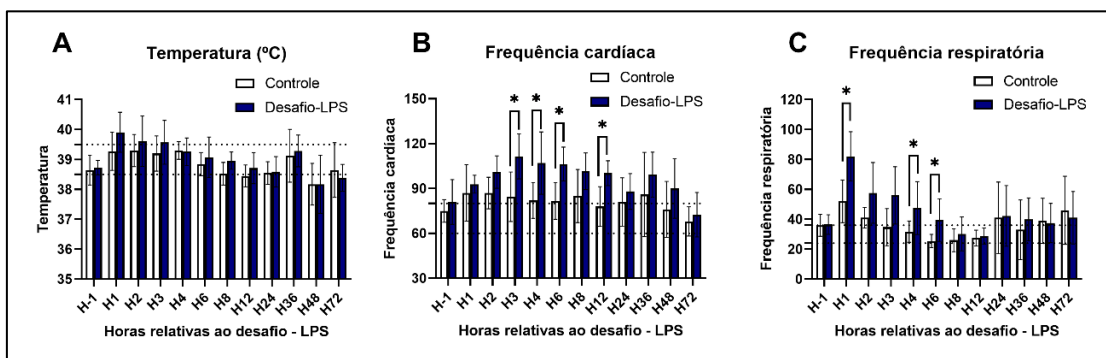
1002

1003

1004

Na avaliação da média da temperatura retal não houve diferença entre os grupos experimentais, contudo o grupo desafio-LPS apresentou resposta febril por 3 h (T +1h, T +2h e T +3h), com pico de  $39,9 \pm 0,7$  °C no T +1h (Figura 3 A). Além disso, a frequência cardíaca aumentou após a administração de LPS, com diferenças significativas nos momentos T +3h ( $P= 0,020$ ), T +4h ( $P= 0,038$ ), T +6h ( $P= 0,012$ ) e T +12h ( $P= 0,010$ ), respectivamente com aumentos de 31,9 %, 30,5 %, 30,1 % e 28,5%. O retorno aos níveis basais ocorreu somente em T +72h (Figura 3 B).

A infusão com LPS aumentou significativamente a média da frequência respiratória, com pico de  $82,1 \pm 16,4$  mpm uma hora após o desafio (T +1h). Houve diferença significativa entre os grupos em T +1h ( $P= 0,026$ ), T +4h ( $P= 0,044$ ) e T +6h ( $P= 0,028$ ), respectivamente, com aumentos de 57,9 %, 49,6 % e 54,9 % (Figura 3 C).



1005

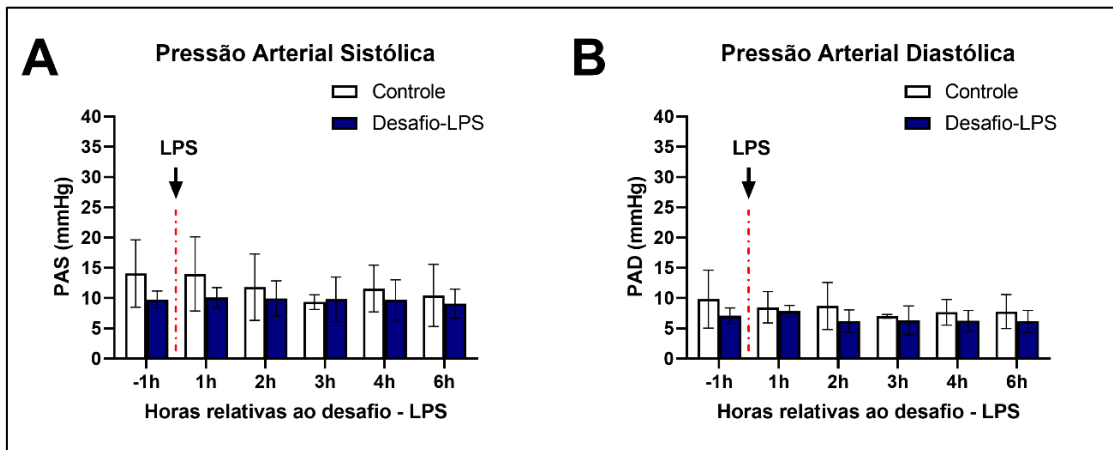
1006

1007

1008

**Figura 3.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso de *E. coli* (O111:B4) em bezerros mestiços, criados em clima tropical na temperatura retal (A), frequência cardíaca (B) e frequência respiratória (C). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  DP.

1009 Na avaliação da pressão arterial indireta sistólica e diastólica, não houve diferença entre os grupos  
 1010 experimentais (Figura 4). Os animais do grupo desafio-LPS se apresentaram normotensos, com valores médios de  
 1011 10/7mmHg em H+1 (T+1h) e 9/6 mmHg nos tempos H+2, +3, +4 e +6. Enquanto, os animais do grupo controle  
 1012 apresentaram hipotensão leve, 14/8 mmHg em H+1; 11/8 mmHg no H+2; 9/7 mmHg no H+3; 11/7 mmHg no  
 1013 H+4; e, 10/7 mmHg no H+6.



1014

1015 **Figura 4.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4) em  
 1016 bezerros mestiços, criados em clima tropical, na pressão arterial indireta sistólica (A) e pressão arterial diastólica  
 1017 (B). Os resultados são apresentados como médias ± DP.

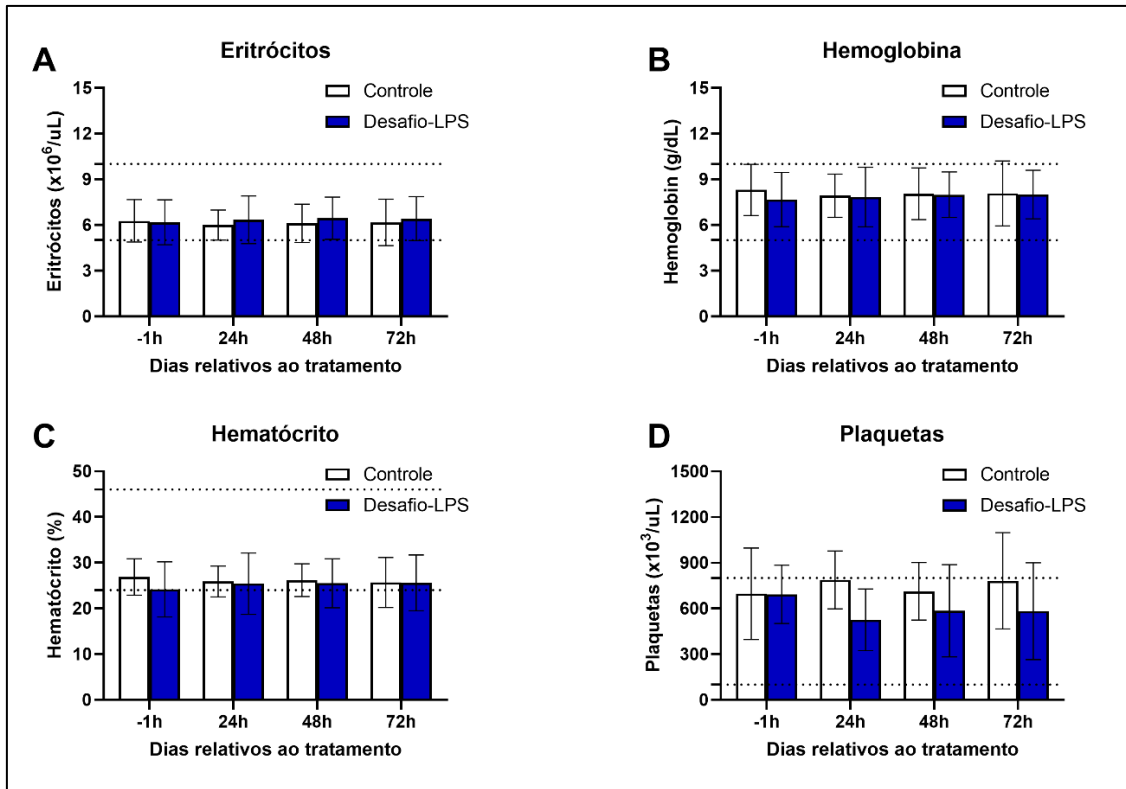
1018

#### 1019 2.4.2. Hemograma, glicemia e lactato

1020

1021 Em relação ao hemograma, o eritrograma (hemácias, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM e plaquetas)  
 1022 permaneceram dentro dos limites estabelecidos para bovinos (Smith, 2014), sem diferença nos momentos antes (T  
 1023 -1h) e depois (T+24h, T+48h e T+72) do desafio com LPS (Figura 5).

1024



1025

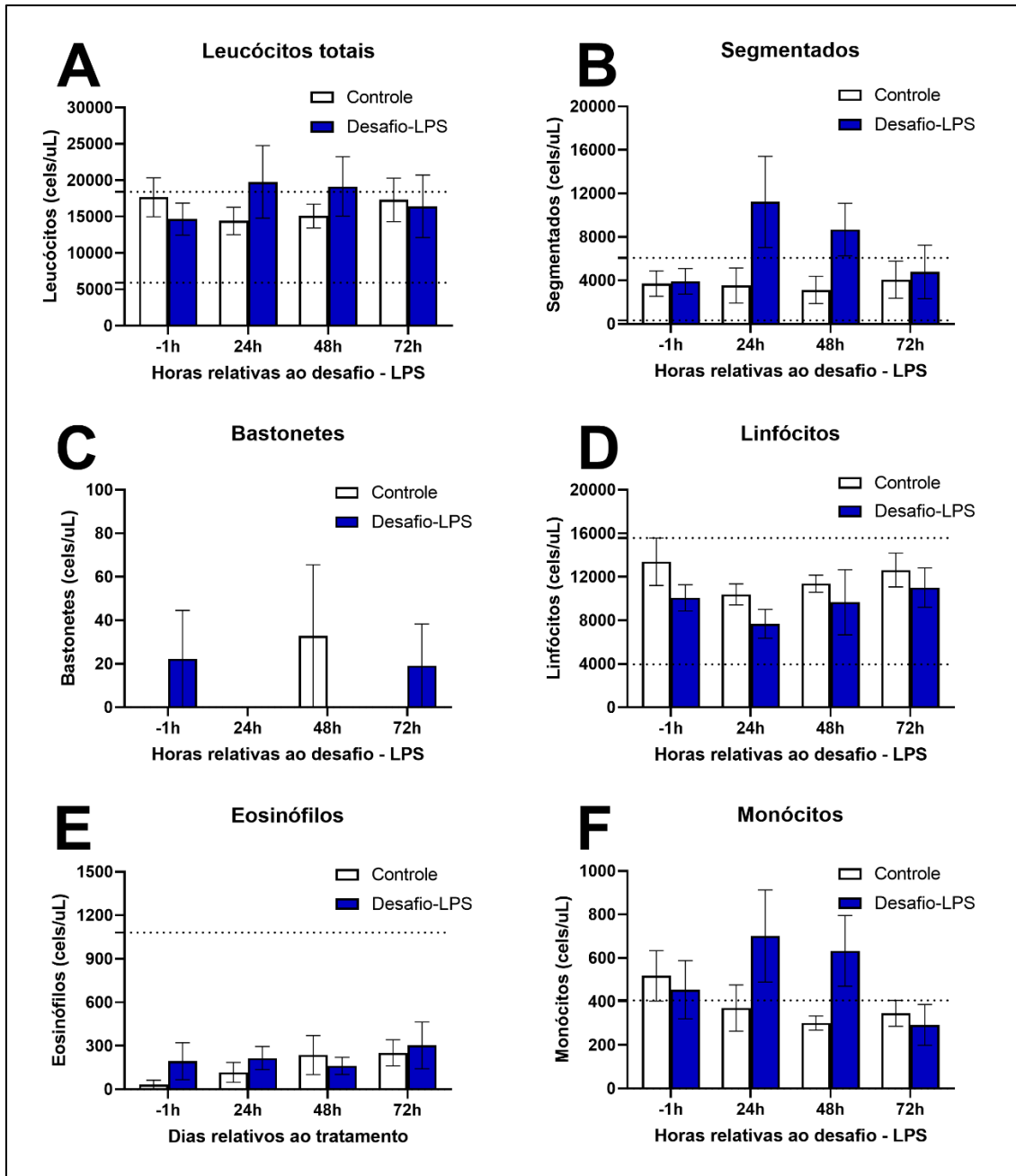
1026 **Figura 5.** Efeito da infusão de 0,5 μg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4) em  
 1027 bezerras mestiças, criados em clima tropical, nos valores médios de eritrócitos (A), hemoglobina (B), hematócrito  
 1028 (C) e plaquetas (D). Os resultados são expressos como médias ± DP.

1029

1030 Os valores médios de leucócitos totais e diferenciais, durante o desafio com LPS, estão apresentados na  
 1031 Figura 6. Os valores médios de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos não  
 1032 apresentaram diferença entre os grupos experimentais nos momentos avaliados antes (T -1h) e 24, 48 e 72 horas.  
 1033 Os animais do grupo desafio-LPS apresentaram um quadro marcante de leucocitose com neutrofilia e monocitose  
 1034 24 e 48 horas após o desafio com LPS. Os valores médios de leucócitos totais, segmentados e monócitos as 24  
 1035 horas foram  $19.142,9 \pm 13.172,8$  cels/μL e as 48 horas foram  $19.142,9 \pm 10.805,4$  cels/μL.

1036





1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

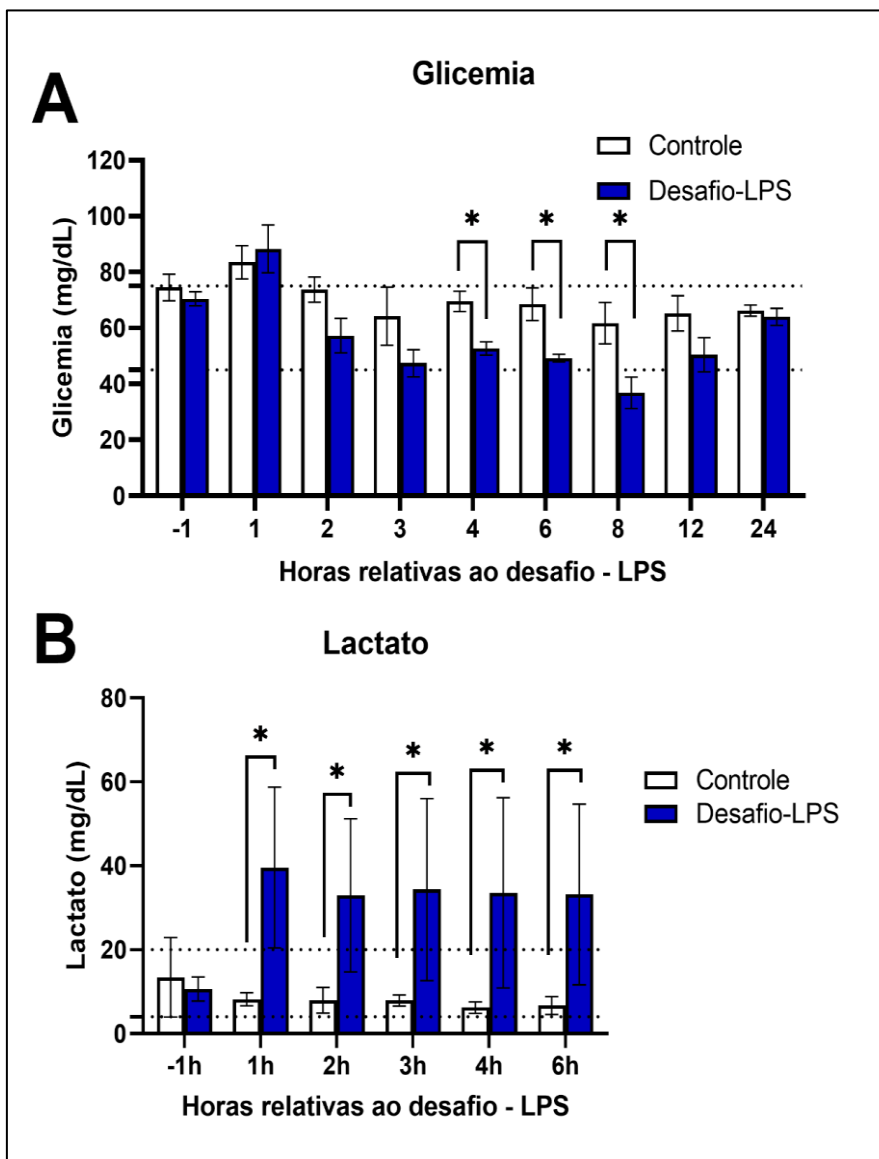
1046

**Figura 6.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4) em bezerros mestiços, criados em clima tropical, nos valores médios de leucócitos totais (A), neutrófilos segmentados (B), neutrófilos bastonetes (C), linfócitos (D), eosinófilos (E) e monócitos (F). Os resultados são expressos como médias ± DP.

Em relação à avaliação da glicemia (Figura 7A), observou-se em ambos os grupos um quadro hiperglicêmico (> 75 mg/dL) nos momentos T +1h de 83,5 ± 11,9 mg/dL (grupo controle) e 88,3 ± 22,6 mg/dL (grupo desafio-LPS), sem diferença significativa entre os grupos experimentais nesse momento ( $P > 0,05$ ). A concentração plasmática de glicose foi menor no grupo desafio-LPS nos três momentos T +4h ( $P = 0,006$ ), T +6h

1047 ( $P = 0,006$ ) e T +8h ( $P = 0,024$ ). Neste último momento (T +8h) os animais do grupo desafio-LPS apresentaram  
 1048 um quadro de hipoglicemia ( $< 45$  mg/dL), com valores médios de  $36,9 \pm 14,8$  mg/dL.

1049 As concentrações médias de lactato plasmático do grupo desafio-LPS estiveram acima dos valores de  
 1050 referência (4 – 20 mg/dL) em todos os momentos avaliados após o desafio com LPS. Isso pode ser explicado pela  
 1051 resposta inflamatória e metabólica induzida pela endotoxemia, que resulta em metabolismo anaeróbico e acúmulo  
 1052 de lactato. Esse aumento nas concentrações de lactato também pode estar associado ao aumento observado na  
 1053 frequência cardíaca (FC), pois a endotoxemia estimula uma resposta cardiovascular de aumento da FC para tentar  
 1054 compensar a redução da perfusão tecidual e garantir o fornecimento de oxigênio aos tecidos. Além disso, foram  
 1055 diferentes significativamente em todos os momentos em relação ao grupo controle, que permaneceu dentro dos  
 1056 valores de referência para a espécie (4 – 20 mg/dL) (Figura 7B).



1057

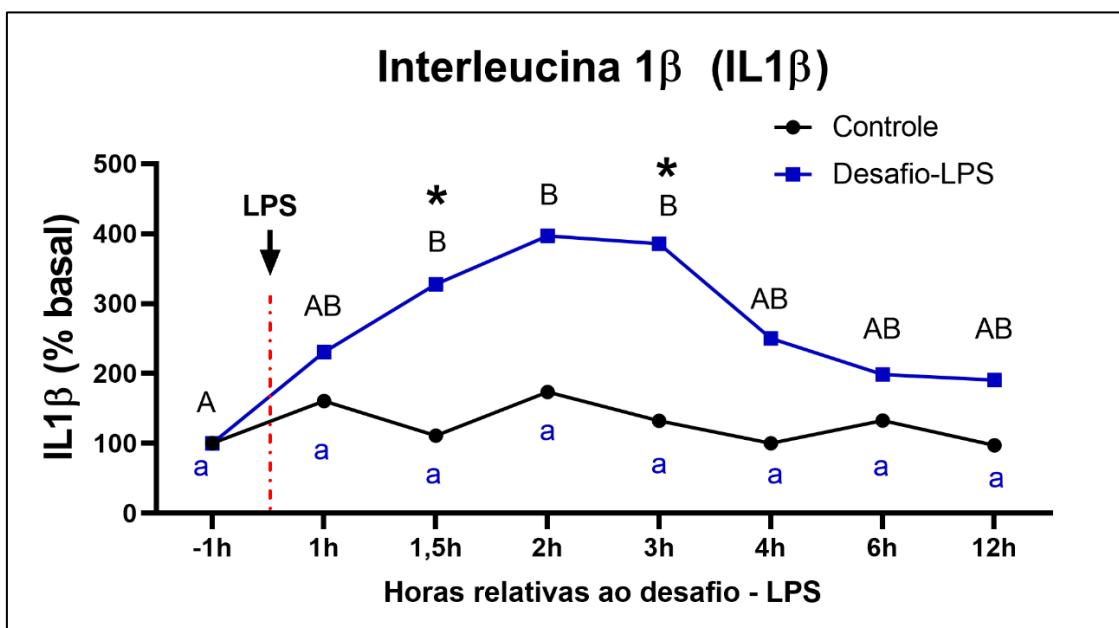
1058 **Figura 7.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4) em  
 1059 bezerros mestiços, criados em clima tropical, na glicemia (A) e lactato plasmático (B). Os resultados são expressos  
 1060 como médias ± DP.

1061

### 1062 2.4.3. ELISA

1063

1064 Nos animais do grupo desafiado com LPS, foi observado aumento significativo na concentração sérica  
 1065 de IL1β ( $P= 0,0026$ ), com um pico de concentração de IL1β no momento T +2h (397,1 % do basal), retornando  
 1066 aos valores antes do desafio (T -1h) no momento T +4h. Não houve variação de IL1β nos momentos avaliados,  
 1067 entre T -1h e T +12h, no grupo controle. Ao se comparar os grupos experimentais, a porcentagem de concentração  
 1068 de IL1β nos animais do grupo desafio-LPS foram superiores nos momentos T +1,5h e T +3h (Figura 8).



1069

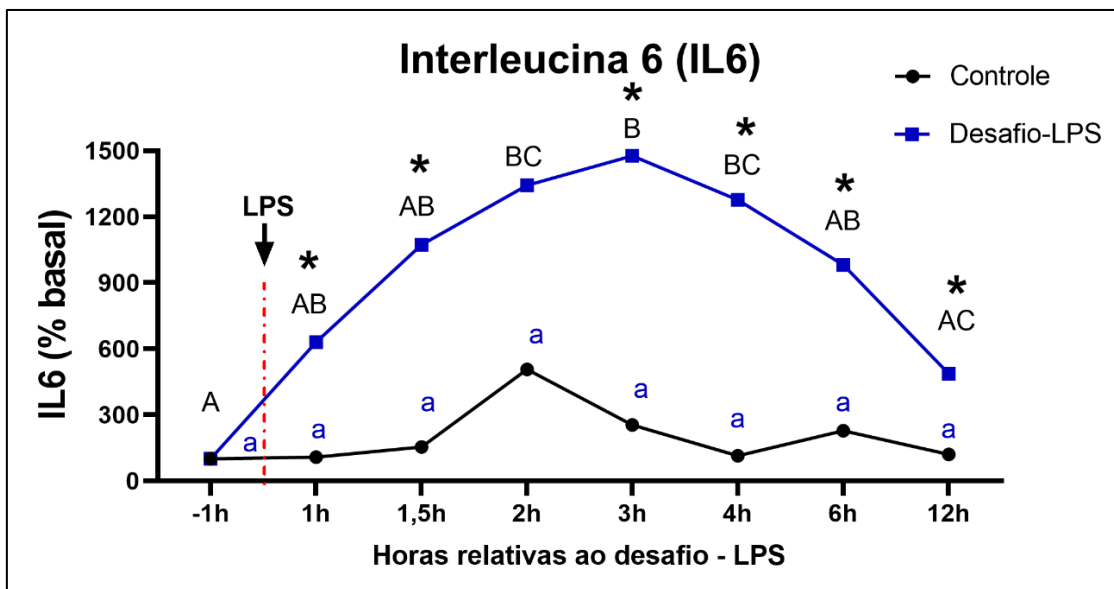
1070 **Figura 8.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4) em  
 1071 bezerros mestiços, criados em clima tropical, na porcentagem de aumento da concentração sérica basal de IL1β.  
 1072 Os resultados são expressos como médias ± DP da concentração sérica basal dos grupos experimentais.

1073

1074 Ao se avaliar as médias da porcentagem de concentrações séricas de IL6, observou-se aumento  
 1075 significativo desta citocina no grupo desafiado com LPS, com pico no momento T +3h e retornando aos valores  
 1076 antes do desafio (T -1h) no momento T +6h. Não houve variação de IL6 no grupo controle, nos momentos  
 1077 avaliados, entre T -1h e T +12h. Na comparação entre os grupos experimentais, a porcentagem da concentração

1078 sérica de IL6 nos animais do grupo desafio-LPS foram superiores em todos os momentos após o desafio, com  
 1079 exceção do momento T +2h (Figura 9).

1080



1081

1082 **Figura 9.** Efeito da infusão de 0,5 µg/kg de lipopolissacarídeo intravenoso de *E. coli* (O111:B4) em bezerros  
 1083 mestiços, criados em clima tropical, na porcentagem de aumento da concentração sérica basal de IL6. Os resultados  
 1084 são expressos como médias ± DP da concentração sérica basal dos grupos experimentais.

1085

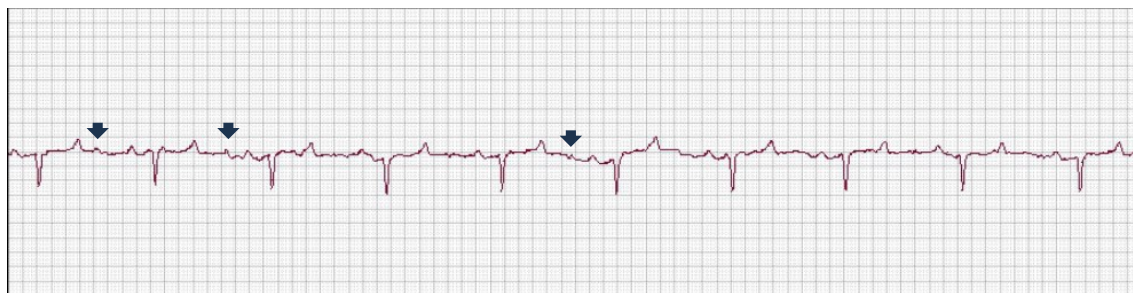
#### 1086 2.4.4. Eletrocardiograma

1087

1088 O exame de ECG foi realizado em todos os bezerros do grupo desafio-LPS, totalizando 36 traçados.  
 1089 Realizou-se em cada momento o total de 6 (T -1h), 4 (T +1h), 7 (T +2h), 6 (T +3h), 7(T +4h) e 6 animais (T +6h),  
 1090 sendo o total de 36 traçados de ECG considerados adequados para interpretação. A variação no número de traçados  
 1091 registrados decorre da movimentação dos animais, impossibilitando a coleta de dados de todos os bezerros em  
 1092 cada momento.

1093 Antes do desafio com LPS (T -1h), nenhum animal do grupo desafio-LPS apresentou alterações no ritmo  
 1094 cardíaco e distúrbios de condução. Contudo, no momento T +1h, 75 % (3/4) dos bezerros apresentaram distúrbio  
 1095 de condução caracterizado por Bloqueio Atrioventricular (BAV) de segundo grau (Figura 10). Na avaliação do  
 1096 momento T +6h, um bezerro (1/6; 16,7%) apresentou alteração no ritmo cardíaco com arritmia ventricular  
 1097 caracterizada por taquicardia ventricular monomórfica (Figura 11).

1098



1099

1100 **Figura 10.** Traçado de ECG registrado em bezerro mestiço 1 hora após o desafio de 0,5 µg/kg de LPS derivado  
 1101 de *E. coli* (O111:B4). Frequência cardíaca de 69 bpm, ritmo sinusal, bloqueio atrioventricular de segundo grau. A  
 1102 seta indica a presença de onda P sem QRS.

1103



1104

1105 **Figura 11.** Traçado de ECG registrado em bezerro mestiço 6 horas após o desafio de 0,5 µg/kg de LPS. derivado  
 1106 de *E. coli* (O111:B4). Taquicardia ventricular 214 bpm e ritmo ventricular com mesma morfologia.

1107

1108 Os valores médios e desvio padrão para os parâmetros e tempos de ECG estão descritos relatados na  
 1109 Tabela 1. Após o desafio com LPS, observou-se uma diferença na amplitude da onda P ( $P = 0,045$ ), mas manteve-  
 1110 se dentro do parâmetro de normalidade, no momento T +2h, e na duração do intervalo QT e/ou QTc ( $P = 0,007$ )  
 1111 nos momentos T +3h, T +4h e T +6h, que coincide com o aumento da FC, justificando o prolongamento. As  
 1112 durações da onda P, durações e amplitudes do complexo QRS e onda T, bem como o intervalo PR e segmento ST  
 1113 não apresentaram alterações após a indução com LPS.

1114

1115 **Tabela 1.** Parâmetros e tempos avaliados no eletrocardiograma de bezerros mestiços desafiados com 0,5 µg/kg de  
 1116 LPS intravenoso derivado de *E. coli* (O111:B4).

Parâmetros de ECG	Horas relativas ao desafio com LPS					
	-1	+1	+2	+3	+4	+6
FC (bpm)	78,0 ± 9,7	89,5 ± 16,4	96,9 ± 7,6	105,2 ± 6,8	109,1 ± 10,0	104,8 ± 10,9
Duração da onda P (segundos)	67,0 ± 13,7	65,0 ± 17,1	61,7 ± 10,0	63,3 ± 12,0	68,0 ± 10,6	65,7 ± 10,6
Amplitude da onda P (mV)	0,133 ± 0,037	0,130 ± 0,014	0,207 ± 0,056	0,198 ± 0,039	0,194 ± 0,055	0,173 ± 0,05
Duração QRS (segundos)	67,7 ± 10,5	75,0 ± 15,5	64,6 ± 15,4	65,3 ± 12,6	60,6 ± 5,86	67,3 ± 5,89
Amplitude da onda R (mV)	0,822 ± 0,302	0,995 ± 0,359	0,931 ± 0,269	0,898 ± 0,283	0,773 ± 0,185	0,815 ± 0,258
Amplitude da onda S (mV)	0,087 ± 0,031	0,097 ± 0,057	0,093 ± 0,027	0,057 ± 0,022	0,074 ± 0,022	0,063 ± 0,024
Amplitude da onda T (mV)	0,488 ± 0,175	0,65 ± 0,438	0,386 ± 0,089	0,433 ± 0,237	0,504 ± 0,273	0,59 ± 0,138
Duração do interv. PR (ms)	161,0 ± 35,3	150,0 ± 21,8	136,0 ± 17,6	135,0 ± 31,3	137,0 ± 23,6	142,0 ± 27,5
Duração do interv. QT (ms)	331,0 ± 23,8	329,0 ± 16,5	307,0 ± 21,1	294,0 ± 13,1	288,0 ± 16,9	277,0 ± 30,6
Duração do interv. QTc (ms)	575,0 ± 20,7	573,0 ± 14,5	554,0 ± 18,6	542,0 ± 12,0	536,0 ± 15,6	526,0 ± 29,1

1117

1118 **2.5. Discussão**

1119

1120 O modelo experimental de indução da inflamação proposto neste estudo, utilizando *bolus* intravenoso de  
1121 0,5 µg/Kg de LPS derivado de *E. coli* (0111:B4) foi capaz de promover uma resposta inflamatória sistêmica de  
1122 intensidade moderada em bezerros mestiços, criados em ambiente tropical.

1123 Neste estudo experimental, um dos objetivos, foi avaliar as respostas clínicas e inflamatórias sistêmicas  
1124 a um desafio agudo de LPS em bezerros mestiços criados em clima tropical. Para tanto, utilizou-se como referência  
1125 os artigos publicados em região de clima temperado, com modelo animal baseado em bezerros holandeses e com  
1126 idade média de 4 semanas (Plessers et al., 2015). A administração de 0,5µg/kg de LPS, neste estudo, desencadeou  
1127 nos bezerros mestiços sinais clínicos indicativos de estímulo e ativação do sistema imune como síndrome febre,  
1128 taquicardia, taquipneia, congestão de mucosas e depressão do nível de consciência, sendo mais evidentes e intensos  
1129 entre 1 a 3 horas após o desafio. Após esta fase, verificou-se melhora gradual do quadro clínico, contudo sem  
1130 retorno aos valores basais. Estes sinais clínicos de endotoxemia desapareceram, em todos os bezerros do grupo  
1131 LPS, somente após 72 horas da indução.

1132 As respostas observadas nos bezerros mestiços foram similares aos modelos experimentais utilizados  
1133 como referência de endotoxemia induzidas em bezerros da raça holandesa, criados em clima temperado ( Plessers  
1134 et al., 2015), além de estudos feitos na região do mediterrâneo com bezerros de 5 semanas de vida (Coskun and  
1135 Sen, 2012) e continental com idade inferior a 21 semanas (Borderas et al., 2008). Também foram similares aos  
1136 encontrados em bezerros da raça Jersey de 1 semana (Ballou et al., 2008), em novilhos machos da raça Angus  
1137 (Carroll et al., 2009) e vacas holandesas (Lohuis et al., 1988; Jacobsen et al., 2004; Chandler et al., 2022;  
1138 Opgenorth et al., 2024), demonstrando que este modelo de indução da inflamação com auxílio de LPS é replicável,  
1139 eficaz, seguro e transitório para a utilização em experimentos que necessitam de animais com esta apresentação  
1140 clínica.

1141 No presente estudo, os bezerros mestiços apresentaram elevação da temperatura corporal imediatamente  
1142 após o desafio com LPS, permanecendo por um período de 3 h e caracterizada por febre monofásica. Contudo,  
1143 não houve diferença entre os grupos, assim como o descrito por Kvidera et al. (2017) em vacas leiteiras desafiadas  
1144 com LPS na dose de 1,5 µg/kg. Plessers et al. (2015) observaram dois padrões de resposta nos animais, um precoce  
1145 em até 5 horas e o outro tardio acima de 6 horas, no qual a maior temperatura corporal foi 4 h após o desafio.

1146 A elevação e duração da temperatura corporal pode variar conforme a dose da endotoxina e a raça dos  
1147 animais (Andersen, 2003; Burdick Sanchez et al., 2015; Gilbert et al., 2024). Doses entre 0,025 e 0,05 µg/kg iv  
1148 induziram febre monofásica em bezerros holandeses com pico 4 horas após o desafio (Borderas et al., 2008),  
1149 enquanto doses de 0,1 µg/kg promoveram uma resposta bifásica em bezerros Jersey com temperaturas corporais  
1150 máximas entre 5 e 12 h (Ballou et al., 2008) e, em bezerros holandese de 1 á 4 horas ao desafio (Coskun and Sen,  
1151 2012). A resposta febril é efeito direto da sinalização periférica e central das citocinas pró-inflamatórias,  
1152 principalmente TNF  $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, além disso a IL6 atua como importante mediador do comportamento de doença  
1153 induzido por LPS (Dantzer and Kelley, 2008), ou seja, as citocinas pró-inflamatórias podem ter participado do  
1154 comportamento doentio exibido pelos bezerros mestiços.

1155 Em resposta ao LPS, o pico da frequência respiratória nos bezerros mestiços desafiados com LPS iv foi  
1156 observado uma hora após o início do desafio. Resultados semelhantes foram descritos por Gilbert et al. (2024) em  
1157 bezerros holandeses de aproximadamente 10 semanas. Por outro lado, movimentos respiratórios máximos foram  
1158 observados 0,5 h após a indução de endotoxemia em bezerros leiteiros de 4 semanas (Plessers et al., 2015; Plessers  
1159 et al., 2015) e em novilhos Angus (Carroll et al., 2009), enquanto picos de FR foram vistos 3 horas nos bezerros  
1160 leiteiros de 20 semanas (Borderas et al., 2008) e vacas leiteiras (Waldron et al., 2003; Jacobsen et al., 2004). A  
1161 administração intravenosa de LPS, ativa o sistema nervoso simpático e estimula o sistema cardiovascular, que

1162 aumenta de forma aguda a produção de catecolaminas e cortisol e, estes podem produzir aumentos nas taxas de  
1163 respiração, assim como temperatura corporal, taxa de suor e aumento nos efeitos catabólicos (Smock et al., 2023).

1164 Neste estudo, os animais desafiados com LPS apresentaram aumento da frequência cardíaca, também  
1165 justificado pela ativação simpática que ocorre frente à endotoxemia, com pico 3 h após a administração,  
1166 permanecendo com taquicardia por aproximadamente 48 horas. Estudos anteriores relataram mudanças na  
1167 frequência cardíaca, como os de Carroll et al. (2009) que relataram aumento da frequência cardíaca em novilhas  
1168 Angus, usando dose de 2,5 µg/kg, 1,6 horas após o desafio; enquanto Plessers et al. (2015) observaram resposta  
1169 bifásica em bezerros (4 semanas) com doses de 0,05µg/kg. Diferentemente, Borderas et al. (2008) não observaram  
1170 alterações da frequência cardíaca em bezerros holandeses (3 -20 semanas), com baixas doses de LPS (0,025 e/ou  
1171 0,05µg/kg).

1172 Ao avaliar a pressão arterial indireta sistólica e diastólica, os animais do grupo controle e desafio LPS  
1173 permaneceram normotensos durante os momentos de avaliações. Constable (1999) observaram instabilidade  
1174 hemodinâmica em bezerros, de 2 semanas de idade, anestesiados e desafiados com endotoxina, na dose de 0,1  
1175 ug/kg/iv (O55:B5). Enquanto, estudos com outras espécies relataram quadros de hipotensão arterial sistêmica,  
1176 após a indução de endotoxemia por LPS, em ratos Wistar (Iwase et al., 2001) e indução em humanos (Coopeland  
1177 et al., 2005).

1178 Os bezerros desafiados com LPS permaneceram com taquicardia durante o período de avaliação, pode  
1179 ser que a normotensão apresentada, nestes bezerros, tenha ocorrido como um mecanismo compensatório da pressão  
1180 arterial sistólica para a manutenção da perfusão tecidual, uma vez que na fase inicial do choque séptico, o processo  
1181 inflamatório leva à vasodilatação e vazamento capilar, que altera o débito cardíaco pela redução da pré-carga  
1182 (Parrilo 1993). De acordo com Morelli et al. (2015), os resultados dessas alterações são devido à hipovolemia  
1183 grave e hipotensão arterial, que ativam a via simpática em uma tentativa fisiológica de manter a perfusão de órgãos  
1184 vitais. Esta ativação está tipicamente associada a taquicardia e vasoconstrição para compensar a vasodilatação  
1185 sistêmica. A taquicardia pode ocorrer na sepse devido à disfunção autonômica, caracterizada pela ativação  
1186 simpatoadrenal excessiva e dessensibilização dos receptores adrenérgicos (Na et al., 2023).

1187 A hiperglicemia nos bezerros ocorreu de forma pontual e transitória uma hora após a administração da  
1188 endotoxina e solução salina, contudo, os bezerros expostos ao LPS iv desenvolveram hipoglicemia oito horas após  
1189 o desafio. A concentração plasmática de glicose pode variar conforme a gravidade da endotoxemia (Constable,  
1190 2017). O aumento da glicose plasmática no início do desafio sugere uma maior mobilização do glicogênio hepático  
1191 (glicogenólise) pela ativação simpática que ocorre no início da endotoxemia (Constable et al, 2017; (Kvidera et



1192 al., 2017). Este quadro de hipoglicemia foi observado durante sepse ou endotoxemia induzida experimentalmente  
1193 em bezerros (Ballou et al., 2008), em vacas (Lohuis et al., 1988; Waldron et al., 2003; Opgenorth et al., 2024) e  
1194 novilhas leiteiras (Steiger et al., 1999). A hipoglicemia induzida por LPS sinalizou que a captação de glicose pelo  
1195 sistema imune sobrecarregou a produção hepática, com redução da utilização sistêmica de glicose nos tecidos  
1196 (Kvidera et al., 2017; Opgenorth et al., 2024).

1197 Os níveis de lactato sanguíneo aumentaram significativamente após a administração de LPS iv e, este  
1198 aumento não foi observado nos animais controle. Apesar de não ser um marcador específico para o diagnóstico de  
1199 hipoperfusão tecidual (Zollo et al., 2019), sugere-se que os animais passaram por um quadro de má perfusão  
1200 tecidual (hipóxia), já que em unidades de terapia intensiva (UTI) o lactato sanguíneo é comumente utilizado como  
1201 marcador indireto de hipóxia tecidual (Karapinar e Dabak 2008) e endotoxemia (Yildiz et al., 2017).

1202 Para estudar os efeitos sistêmicos do LPS na circulação sanguínea periférica, avaliou-se a concentração  
1203 de duas citocinas séricas pró-inflamatórias. Neste estudo, a resposta temporal da citocina IL1 $\beta$  foi semelhante à  
1204 observada por Smock et al. (2023), em novilhos mestiços, após a administração intravenosa de LPS (0,25 $\mu$ g/kg),  
1205 onde o pico de concentração foi observado às 2 horas após a indução. Contudo, no presente estudo, as  
1206 concentrações de IL1 $\beta$  nos bezerros mestiços foram mais expressivas, com aumento de 397,1 % em relação aos  
1207 valores basais. Enquanto Smock et al. (2023) relataram 32 % em relação à concentração pré-desafio. Estudos  
1208 semelhantes, com novilhos Angus, relataram picos de IL1 $\beta$  às 3 horas após o desafio com aumento de 279 % em  
1209 relação à concentração pré-desafio (Carroll et al., 2009), assim como Ning et al. (2018) com aumentos de 226 %  
1210 de IL1 $\beta$  em resposta a indução inflamatória realizada com infusões de baixas doses (0,01  $\mu$ g/kg) de LPS, por  
1211 aproximadamente 6 horas.

1212 A citocina IL6 apresentou sua concentração sérica máxima 3 horas após a indução, com aumento de  
1213 1476,6 %. Este resultado concorda com a resposta temporal do pico de concentração máxima observada em  
1214 novilhos Angus (Carroll et al., 2009) e bezerros holandeses (Plessers et al., 2015; Plessers et al., 2015). Entretanto,  
1215 se contrapõem ao apresentado por Carroll et al. (2015), que observaram concentrações máximas de IL6 em 2 e 6  
1216 horas após o desafio. O aumento das concentrações séricas observadas, neste estudo, sugere que as citocinas pró-  
1217 inflamatória IL1 $\beta$  e IL6 foram reguladas positivamente, indicando uma resposta inflamatória sistêmica aguda em  
1218 resposta à administração do LPS intravenoso.

1219 Ao avaliar o efeito do LPS sob o eritrograma, observou-se que não houve diferenças entre os grupos,  
1220 diferente do relatado por Kvidera et al. (2017) que mostraram aumento de 6 % nos eritrócitos, 8 % de hemoglobina  
1221 e 10% no hematócrito e redução de 63% nas plaquetas 6 horas após a administração do LPS nas vacas. Brauckmann

1222 et al. (2016) demonstraram *in vitro* que o LPS pode induzir interações físico-químicas nas membranas dos  
1223 eritrócitos, resultando em hemólise.

1224 Neste estudo, a contagem total de leucócitos e diferenciais não diferiu entre os grupos e períodos  
1225 avaliados, diferente do descrito em novilhos de corte desafiados com 0,25µg/Kg de LPS, que apresentaram uma  
1226 redução aguda de neutrófilos 1 hora após indução de LPS, com retorno ao valor basal em 36 horas (Smock et al.,  
1227 2023). Chandler et al. (2022) relataram aumento na contagem de neutrófilos e de leucócitos totais em 24 h, com  
1228 retorno aos níveis pré-desafio em 72 h. Uma leucopenia inicial é esperada no primeiro momento do desafio com  
1229 LPS, depois espera-se uma leucocitose e retorno aos níveis basais (Burdick Sanchez et al., 2015; Carroll et al.,  
1230 2015). O desenho do estudo não permitiu a avaliação do leucograma antes de 24h e, apesar dos bezerros mestiços  
1231 apresentarem leucocitose com neutrofilia e monocitose em 24 e 48 horas após o desafio, esse não foi significativo.

1232 Na avaliação do ritmo cardíaco dos bezerros mestiços observou-se maior prevalência do ritmo cardíaco  
1233 sinusal, contudo um bezerro apresentou taquiarritmia ventricular seis horas pós-LPS. Na literatura consultada,  
1234 taquiarritmias ventriculares ainda não foram relatadas anteriormente em bezerros, novilhos e vacas com  
1235 endotoxemia induzida experimentalmente. Há relatos de taquiarritmias atriais em porquinhos-da-índia, após a  
1236 administração de 300 µg/kg LPS intraperitoneal (Aoki et al., 2012). Yücel et al. (2017) ao desafiarem *in vitro*  
1237 células-tronco pluripotentes de cardiomiócitos humanos com LPS, observaram um prolongamento da duração do  
1238 potencial de ação, que pode predispor a arritmias, o que poderia explicar, pelo menos parcialmente, as  
1239 taquiarritmias observadas em modelos inflamatórios de animais ou em pacientes com sepse.

1240 Ao avaliar a condução cardíaca, três bezerros apresentaram BAV de Segundo Grau 1 h após a  
1241 administração de LPS. Este distúrbio ocorreu de forma transitória, uma vez que não foram observados em outros  
1242 traçados de ECG nos tempos de estudo. Os registros de ECG basais, antes do início do desafio – LPS, não  
1243 apresentaram alterações no ritmo e condução cardíaca. Considerando isso, parece possível que os eventos de  
1244 arritmia e BAV possam estar relacionados a indução de endotoxemia.

1245 Neste estudo, observou-se na derivação D II um aumento da amplitude da onda P duas horas após o  
1246 desafio com LPS, o que pode ser devido a um estado de simpato-excitação (Field et al., 2018). Além disso, os  
1247 bezerros mestiços apresentaram uma redução do intervalo Qt/QTc. De acordo com Tilley and Smith (2008), o  
1248 intervalo Qtc tende a diminuir em frequências cardíacas elevadas, o que foi observado neste estudo. Contudo,  
1249 distúrbios eletrolíticos de hipercalemia e hipercalcemia também podem reduzir sua duração (Tse et al., 2016).

1250 O presente estudo caracterizou o modelo experimental de indução de resposta inflamatória aguda em  
1251 bezerros mestiços, criados em condições tropicais, em resposta ao desafio com LPS. Em consonância com estudos

1252 anteriores, realizados em bezerros holandeses oriundos de outras condições climáticas, os bezerros mestiços  
1253 apresentaram, de forma segura e transitório um quadro inflamatório agudo de intensidade moderada.

1254         Desta forma, portanto, esta pesquisa validou este modelo experimental também para bezerros mestiços  
1255 criados em ambiente tropical para a compreensão de quadros de inflamação sistêmica por LPS (Carroll et al.,  
1256 2009), podendo ser utilizado para interpretar o efeito das propriedades imunomoduladoras de anti-inflamatórios  
1257 não esteroidais (Plessers et al., 2016), esteroidais (Plessers et al., 2015) e antimicrobianos (Plessers et al., 2015;  
1258 Plessers et al., 2016).

1259         Além disso, mostrou que pode ser utilizado para avaliar os efeitos da endotoxemia nos distúrbios de  
1260 condução cardíaca, sendo esse trabalho um dos primeiros a mostrar os resultados em bezerros mestiços criados em  
1261 ambiente tropical desafiados com LPS.

1262

#### 1263 **Acknowledgments**

1264 The authors are grateful to the farmers and veterinarians involved in the clinical examinations and data collection.

1265

#### 1266 **Funding**

1267 This research was funded by FAPEMIG, grant number APQ-00332-17

1268

#### 1269 **Declaration of Competing Interest:**

1270 The authors declare no conflict of interest.

1271

#### 1272 **Author Contributions**

1273 Conceptualization, J.S. and V.B.; methodology, J.S., V.B., and B.S.; formal analysis, J.S., B.S., O.R. and V.B.;  
1274 investigation, B.S., O.R., V.B. and L.M.; resources, J.S., and V.B.; data curation, J.S.; writing—original draft  
1275 preparation, B.S., L.M., and J.S.; writing—review and editing, B.S., L.M., and J.S.; supervision, V.B. and J.S.;  
1276 project administration, J.S. and V.B.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

1277

#### 1278 **Data Availability**

1279 Further information on the data and methodologies will be made available by the author for correspondence, as  
1280 requested.

1281

1282 **Referências**

1283

1284 Andersen, P.H., 2003. Bovine endotoxemia - Some aspects of relevance to production diseases. A review *Acta*  
1285 *Veterinaria Scandinavica*, Supplement, 141–155. PMID: 15259787

1286

1287 Aoki, Y., Hatakeyama, N., Yamamoto, S., Kinoshita, H., Matsuda, N., Hattori, Y. and Yamazaki, M., 2012. Role  
1288 of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs *British Journal of Pharmacology*,  
1289 166, 390–400. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01769.x

1290

1291 Ballou, M.A., Cruz, G.D., Pittroff, W., Keisler, D.H. and DePeters, E.J., 2008. Modifying the acute phase response  
1292 of Jersey calves by supplementing milk replacer with omega-3 fatty acids from fish oil *Journal of Dairy*  
1293 *Science*, 91, 3478–3487 (Elsevier). DOI: 10.3168/jds.2008-1016

1294

1295 Borderas, T.F., De Passillé, A.M. and Rushen, J., 2008. Behavior of dairy calves after a low dose of bacterial  
1296 endotoxin *Journal of Animal Science*, 86, 2920–2927. DOI: 10.2527/jas.2008-0926

1297

1298 Bourazak, L.A. and Hofmeister, E.H., 2018. Bias, sensitivity, and specificity of doppler ultrasonic flow detector  
1299 measurement of blood pressure for detecting and monitoring hypotension in anesthetized dogs *Journal of the*  
1300 *American Veterinary Medical Association*, 253, 1433–1438. DOI: 10.2460/javma.253.11.1433

1301

1302 Brauckmann, S., Effenberger-Neidnicht, K., De Groot, H., Nagel, M., Mayer, C., Peters, J. and Hartmann, M.,  
1303 2016. Lipopolysaccharide-induced hemolysis: Evidence for direct membrane interactions *Scientific Reports*,  
1304 6, 1–9. DOI: 10.1038/srep35508

1305

1306 Burdick Sanchez, N.C., Carroll, J.A., Donaldson, J.R., Buntyn, J.O. and Schmidt, T.B., 2015. Exogenous  
1307 administration of lipids to steers alters aspects of the innate immune response to endotoxin challenge *Innate*  
1308 *Immunity*, 21, 512–522. DOI: 10.1177/1753425914552741

1309

1310 Carroll, J.A., Burdick Sanchez, N.C., Hulbert, L.E., Ballou, M.A., Dailey, J.W., Caldwell, L.C., Vann, R.C., Welsh,  
1311 T.H. and Randel, R.D., 2015. Sexually dimorphic innate immunological responses of pre-pubertal Brahman  
1312 cattle following an intravenous lipopolysaccharide challenge *Veterinary Immunology and*  
1313 *Immunopathology*, 166, 108–115 (Elsevier B.V.). DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.06.009

1314

1315 Carroll, J.A., Reuter, R.R., Chase, C.C., Coleman, S.W., Riley, D.G., Spiers, D.E., Arthington, J.D. and Galyean,  
1316 M.L., 2009. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose  
1317 lipopolysaccharide challenge *Innate Immunity*, 15, 81–89. DOI: 10.1177/1753425908099170

1318

1319 Chandler, T.L., Westhoff, T.A., Sipka, A.S., Overton, T.R. and Mann, S., 2022. Lipopolysaccharide challenge  
1320 following intravenous amino acid infusion in postpartum dairy cows: II. Clinical and inflammatory responses

- 1321 Journal of Dairy Science, 105, 4611–4623 (American Dairy Science Association). DOI: 10.3168/jds.2021-  
1322 21227  
1323
- 1324 Cicogna, M., Boni, P., Frigo, T. and Caivano, D., 2022. Base-apex electrocardiographic examination in healthy  
1325 cows of Chianina breed Open Veterinary Journal, 12, 951–955. DOI: 10.5455/OVJ.2022.v12.i6.22  
1326
- 1327 Constable, P.D., 1999. Acute endotoxemia increases left ventricular contractility and diastolic stiffness in calves  
1328 Shock, 12, 391–401. DOI: 10.1097/00024382-199911000-00008  
1329
- 1330 Coskun, A. and Sen, I., 2012. Journal of Veterinary Sciences Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 4, 194–198  
1331
- 1332 Dantzer, R. and Kelley, K.W., 2008. Nihms-16681.Pdf 21, 153–160  
1333
- 1334 Dickson, M.J., Kvidera, S.K., Horst, E.A., Wiley, C.E., Mayorga, E.J., Ydstie, J., Perry, G.A., Baumgard, L.H. and  
1335 Keating, A.F., 2019. Impacts of chronic and increasing lipopolysaccharide exposure on production and  
1336 reproductive parameters in lactating Holstein dairy cows Journal of Dairy Science, 102, 3569–3583  
1337 (American Dairy Science Association). DOI: 10.3168/jds.2018-15631  
1338
- 1339 Field, M.E., Donato, P., Bottoni, N., Iori, M., Brignole, M., Kipp, R.T., Kopp, D.E., Leal, M.A., Eckhardt, L.L.,  
1340 Wright, J.M., Walsh, K.E., Page, R.L. and Hamdan, M.H., 2018. P-wave amplitude and PR changes in  
1341 patients with inappropriate sinus tachycardia: Findings supportive of a central mechanism Journal of the  
1342 American Heart Association, 7, 1–6. DOI: 10.1161/JAHA.118.008528  
1343
- 1344 Geddes, L.A., Combs, W. and Denton, W., 1980. Indirect mean arterial pressure in the anesthetized dog American  
1345 Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 7, 130–132. DOI:  
1346 10.1152/ajpheart.1980.238.5.H664  
1347
- 1348 Gilbert, M.S., Lammers, A. and Gerrits, W.J.J., 2024. High variation in the response of calves to a low-dose  
1349 lipopolysaccharide challenge is associated with early-life measurements JDS Communications, 5, 220–224  
1350 (American Dairy Science Association). DOI: 10.3168/jdsc.2023-0437  
1351
- 1352 Hang, B., Milla, B.T., Gillardin, S., Phuong, V., Thanh, N. and Kestemont, P., 2013. In vivo effects of Escherichia  
1353 coli lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish  
1354 (Pangasianodon hypophthalmus) Fish and Shellfish Immunology, 34, 339–347 (Elsevier Ltd). DOI:  
1355 10.1016/j.fsi.2012.11.025  
1356
- 1357 Horst, E.A., Kvidera, S.K., Dickson, M.J., McCarthy, C.S., Mayorga, E.J., Al-Qaisi, M., Ramirez, H.A., Keating,  
1358 A.F. and Baumgard, L.H., 2019. Effects of continuous and increasing lipopolysaccharide infusion on basal  
1359 and stimulated metabolism in lactating Holstein cows Journal of Dairy Science, 102, 3584–3597 (American  
1360 Dairy Science Association). DOI: 10.3168/jds.2018-15627

- 1361 Iwase, M., Yokota, M., Kitaichi, K., Wang, L., Takagi, K., Nagasaka, T., Izawa, H. and Hasegawa, T., 2001.  
1362 Cardiac functional and structural alterations induced by endotoxin in rats: importance of platelet-activating  
1363 factor. *Critical care medicine*, 29, 609–617 (United States). DOI: 10.1097/00003246-200103000-00025  
1364
- 1365 Jacobsen, S., Andersen, P.H., Toelboell, T. and Heegaard, P.M.H., 2004. Dose dependency and individual  
1366 variability of the lipopolysaccharide- induced bovine acute phase protein response *Journal of Dairy Science*,  
1367 87, 3330–3339 (Elsevier). DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73469-4  
1368
- 1369 Kakihana, Y., Ito, T., Nakahara, M., Yamaguchi, K. and Yasuda, T., 2016. Sepsis-induced myocardial dysfunction:  
1370 Pathophysiology and management *Journal of Intensive Care*, 4, 1–10 (*Journal of Intensive Care*). DOI:  
1371 10.1186/s40560-016-0148-1  
1372
- 1373 Karapinar, T. and Dabak, M., 2008. Treatment of Premature Calves with Clinically Diagnosed Respiratory Distress  
1374 Syndrome. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 22, 462–466. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0074.x  
1375
- 1376 Kvidera, S.K., Horst, E.A., Abuajamieh, M., Mayorga, E.J., Fernandez, M.V.S. and Baumgard, L.H., 2017. Glucose  
1377 requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows *Journal of Dairy Science*, 100, 2360–  
1378 2374 (American Dairy Science Association. DOI: 10.3168/jds.2016-12001  
1379
- 1380 Lohuis, J.A., Verheijden, J.H., Burvenich, C. and van Miert, A.S., 1988. Pathophysiological effects of endotoxins  
1381 in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated  
1382 administration. *The Veterinary quarterly*, 10, 109–116. DOI: 10.1080/01652176.1988.9694157  
1383
- 1384 Lu, Y.C., Yeh, W.C. and Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway *Cytokine*, 42, 145–151. DOI:  
1385 10.1016/j.cyto.2008.01.006  
1386
- 1387 Morelli, A., D'Egidio, A. and Passariello, M., 2015. Tachycardia in Septic Shock: Pathophysiological Implications  
1388 and Pharmacological Treatment *BT - Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2015* 115–  
1389 128. DOI: 10.1007/978-3-319-13761-2\_9  
1390
- 1391 Na, S.J., Oh, D.K., Park, S., Lee, Y.J., Hong, S.B., Park, M.H., Ko, R.E., Lim, C.M. and Jeon, K., 2023. The  
1392 Association Between Tachycardia and Mortality in Septic Shock Patients According to Serum Lactate Level:  
1393 A Nationwide Multicenter Cohort Study *Journal of Korean Medical Science*, 38, 1–11. DOI:  
1394 10.3346/jkms.2023.38.e313  
1395
- 1396 Ning, L.T., Dong, G.Z., Ao, C., Zhang, D.G., Erdene, K., Zhang, F.Q., Wen, J. and Zhang, T.L., 2018. Effects of  
1397 continuous low dose infusion of lipopolysaccharide on inflammatory responses, milk production and milk  
1398 quality in dairy cows *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102, e262–e269. DOI:  
1399 10.1111/jpn.12851  
1400

- 1401 Opgenorth, J., Mayorga, E.J., Abeyta, M.A., Rodriguez-Jimenez, S., Goetz, B.M., Freestone, A.D. and Baumgard,  
1402 L.H., 2024. Intravenous lipopolysaccharide challenge in early- versus mid-lactation dairy cattle. II: The  
1403 production and metabolic responses *Journal of Dairy Science*, 107, 6240–6251 (American Dairy Science  
1404 Association). DOI: 10.3168/jds.2023-22852  
1405
- 1406 Plessers, E., Watteyn, A., Wyns, H., Pardon, B., De Backer, P. and Croubels, S., 2015. Study of the  
1407 immunomodulatory properties of gamithromycin and dexamethasone in a lipopolysaccharide inflammation  
1408 model in calves *Research in Veterinary Science*, 103, 218–223 (Elsevier Ltd). DOI:  
1409 10.1016/j.rvsc.2015.05.012  
1410
- 1411 Plessers, Elke, Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Backer, P. and Croubels, S., 2015. Characterization of an  
1412 intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response  
1413 *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163, 46–56 (Elsevier B.V.). DOI:  
1414 10.1016/j.vetimm.2015.01.004  
1415
- 1416 Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Baere, S., Sys, S.U., De Backer, P. and Croubels, S., 2016.  
1417 Immunomodulatory properties of gamithromycin and ketoprofen in lipopolysaccharide-challenged calves  
1418 with emphasis on the acute-phase response *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, 28–37  
1419 (Elsevier B.V.). DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002  
1420
- 1421 Rezakhani, A., Paphan, A.A. and Shekarfroush, S., 2004. Analysis of base apex lead electrocardiograms of normal  
1422 dairy cows *Veterinarski Arhiv*, 74, 351–358  
1423
- 1424 Smock, T.M., Broadway, P.R., Sanchez, N.C.B., Carroll, J.A., Theurer, M.E. and Hales, K.E., 2023. An updated  
1425 profile of the bovine acute phase response following an intravenous lipopolysaccharide challenge *Journal of*  
1426 *Animal Science*, 101, 1–16. DOI: 10.1093/jas/skac282  
1427
- 1428 Steiger, M., Senn, M., Altreuther, G., Werling, D., Sutter, F., Kreuzer, M. and Langhans, W., 1999. Effect of a  
1429 prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers *Journal of Animal*  
1430 *Science*, 77, 2523–2532. DOI: 10.2527/1999.7792523x  
1431
- 1432 Terra, R.L. and Reynolds, J.P., 2014. Ruminant history, physical examination, welfare assessment, and records In:  
1433 B. P. Smith (ed), *Large animal internal medicine*, (Elsevier Mosby), 52–63  
1434
- 1435 Tilley, L.P. and Smith, F.W.K., 2008. Chapter 3 - Electrocardiography In: L. P. Tilley , F. W. K. Smith , M. A.  
1436 Oyama , and M. M. B. T.-M. of C. and F. C. (Fourth E. Sleeper (eds), *Manual of Canine and Feline*  
1437 *Cardiology*, (W.B. Saunders: Saint Louis), 49–77  
1438

- 1439 Tse G, Sun B, Wong ST, Tse V, Yeo JM. Anti-arrhythmic effects of hypercalcemia in hyperkalemic, Langendorff-  
1440 perfused mouse hearts. *Biomed Rep.* 2016 Sep;5(3):301-310. doi: 10.3892/br.2016.735. Epub 2016 Aug 2.  
1441 PMID: 27588173; PMCID: PMC4998139.  
1442
- 1443 Waldron, M.R., Nishida, T., Nonnecke, B.J. and Overton, T.R., 2003. Effect of lipopolysaccharide on indices of  
1444 peripheral and hepatic metabolism in lactating cows *Journal of Dairy Science*, 86, 3447–3459 (Elsevier).  
1445 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73951-6  
1446
- 1447 Yildiz, R., Aydogdu, U., Guzelbektes, H., Coskun, A. and Sen, I., 2017. Venous lactate, pH and partial pressure of  
1448 carbon dioxide levels as prognostic indicators in 110 premature calves with respiratory distress syndrome  
1449 *Veterinary Record*, 180, 611. DOI: 10.1136/vr.104074  
1450
- 1451 Yücel, G., Zhao, Z., El-Battrawy, I., Lan, H., Lang, S., Li, X., Buljubasic, F., Zimmermann, W.H., Cyganek, L.,  
1452 Utikal, J., Ravens, U., Wieland, T., Borggrefe, M., Zhou, X.B. and Akin, I., 2017. Lipopolysaccharides  
1453 induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem  
1454 cell derived cardiomyocytes *Scientific Reports*, 7, 1–13. DOI: 10.1038/s41598-017-00993-z  
1455
- 1456 Zollo, A.M., Ayoob, A.L., Prittie, J.E., Jepson, R.D., Lamb, K.E. and Fox, P.R., 2019. Utility of admission lactate  
1457 concentration, lactate variables, and shock index in outcome assessment in dogs diagnosed with shock  
1458 *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 29, 505–513. DOI: 10.1111/vec.12868  
1459
- 1460



1461 **CAPÍTULO 3 – EVALUATION OF INFLAMMATORY AND PRODUCTION EFFECTS IN**  
1462 **VACCINATION OF CROSSBRED DAIRY COWS RAISED IN A TROPICAL CLIMATE**

1463  
1464 **Artigo nas normas para publicação na revista**  
1465 **Tropical Animal Health and Production**

1466  
1467 Beatryz Fonseca da Silva<sup>1,2,3</sup>, Vinicius de Moraes Barbosa<sup>1</sup>, Débora Maria Barbosa Prado<sup>1</sup>, Alceu Pereira  
1468 Alvarenga Neto<sup>1</sup>, Layane Queiroz Magalhães<sup>1</sup>, João Paulo Elsen Saut<sup>1,4\*</sup>

1469  
1470 <sup>1</sup> Large Animal Health Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, Minas  
1471 Gerais, Brazil.

1472 <sup>2</sup> Fazenda Escola de Ensino e Pesquisa, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil.

1473 <sup>3</sup> Clínica Veterinária Universitária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Norte do  
1474 Tocantins, Tocantins, Brasil

1475 <sup>4</sup> Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile,  
1476 Valdivia, Chile.

1477  
1478 \* **Corresponding author:**

1479 *Email address:* joao.elsen@uach.cl; <https://orcid.org/0000-0002-0860-5413>

1480  
1481 **Abstract**

1482 The present study aimed to evaluate the effects of vaccination in lactating crossbred dairy cows (Gir x Holstein)  
1483 raised in a tropical climate, using a commercial multivalent inactivated vaccine on local inflammatory, systemic  
1484 response, and milk production. In this study, 68 lactating cows, including 31 primiparous and 37 multiparous, were  
1485 vaccinated with a single dose. The animals were evaluated by measuring rectal temperature, vaccination site, white  
1486 blood cell count, total proteins and fractions, acute phase protein and milk production on the days before (D-7 and  
1487 D0) and after vaccination (D+1, D+3, and D+7). There was an increase in rectal temperature (D+1) in both  
1488 primiparous (P=0.0013) and multiparous (P=0.0002) cows. At D+7, all animals had a local reaction (P<0.0001).  
1489 Systemic reaction was observed in multiparous cows concerning leukogram values (P=0.0319) and neutrophils  
1490 (P=0.0230) at D+1, haptoglobin concentration at D+3 (P=0.0470) and D+7 (P=0.0146), and fibrinogen (P=0.0104)  
1491 at D+3. For primiparous cows, there was a change in fibrinogen (P=0.0101) at D+3. There were reductions in milk  
1492 production at D+1, with a decrease of 10% for primiparous and 9.2% for multiparous. The results of this study

1493 suggest that vaccination induced a short-duration acute-phase response, being more prominent in multiparous  
1494 cows.

1495 **Keywords:** *inflammation, acute-phase proteins, vaccine, dairy cows, adverse reactions, milk production*  
1496

### 1497 **3.1. Introduction**

1498

1499 Infectious diseases such as Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)  
1500 cause significant economic losses in livestock worldwide due to their negative impact on animal health and milk  
1501 production (De Brun et al., 2021; Su et al., 2023). The use of vaccines in prophylaxis remains the most cost-  
1502 effective way to control infectious diseases, as it plays an important role in biosecurity management by preventing  
1503 infection, controlling the spread of disease, and reducing reproductive losses (Walz et al., 2020).

1504 Currently, vaccines against Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Infectious Bovine Rhinotracheitis  
1505 (IBR) are available, containing either modified live viruses or inactivated (killed) viruses, often formulated in  
1506 combination with other viral and bacterial antigens. These formulations can be presented in monovalent or  
1507 multivalent formulations (Castrucci et al., 2002; Newcomer et al., 2015). Both modified live virus vaccines and  
1508 inactivated/killed virus vaccines are well-established in controlling BVDV infection (Reber et al., 2006) and IBR  
1509 virus (Castrucci et al., 2002; De Brun et al., 2021).

1510 The main advantage of using modified live virus vaccines is their greater protection and longer duration  
1511 of immunity (Newcomer et al., 2015). Killed virus vaccines are considered safer than modified live virus vaccines  
1512 because they do not have immunosuppressive or fetal pathogenic profiles, although they are not as effective in  
1513 inducing T-cell-mediated immunity and providing protection against a variety of BVDV strains (Platt et al., 2008;  
1514 Ridpath, 2013).

1515 The use of adjuvants or other immunostimulants in vaccines with inactivated (killed) viruses is necessary  
1516 to increase immunogenicity and improve the limitations and duration of the immune response (Francis, 2018).  
1517 Adjuvants contribute to the initiation of the innate immune response induced by antigens, as exemplified by  
1518 inflammatory responses at the vaccine application site, mainly localized and of short duration (Di Pasquale et al.,  
1519 2015; Francis, 2018).

1520 After vaccination, the recruitment of macrophages and dendritic cells is expected, at the site of the  
1521 antigen-adjuvant combination the induction of inflammation with vaccination is normal and expected and a  
1522 manifestation of the acute phase protein that is part of the innate immune system may develop (Khalil and Al-  
1523 humadi, 2020).

1524 According to Di Pasquale et al. (2015) higher levels of viral neutralizing antibodies were associated with  
1525 the inactivated BVDV vaccine containing adjuvant components such as carbomer, Quil A cholesterol, distearoyl  
1526 dimethylammonium chloride (DDA), and montanide oil. Similarly, De Brun et al. (2021) observed that Hereford  
1527 heifers vaccinated with an inactivated vaccine of Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1), Bovine Viral Diarrhea  
1528 Virus (BVDV-1), *Campylobacter fetus*, *Histophilus somni*, and *Leptospira spp.* in aluminum hydroxide adjuvant  
1529 developed neutralizing antibody titers  $\geq 1:8$ , 60 days post-vaccination.

1530 Vaccination is not a risk-free procedure and can cause adverse events. Research reports that lactating  
1531 cows vaccinated with different types of antigens and antigen-adjuvant combinations may exhibit signs of fever  
1532 syndrome and reactions at the site of injection during the post-vaccination period (Schulze et al., 2016; Baccili et  
1533 al., 2019), as well as a reduction in milk production (Scott et al., 2001; Bergeron and Elsener, 2008; Schulze et al.,  
1534 2016).

1535 In crossbred (Gir x Holstein) dairy cows, raised under management and tropical climate conditions, there  
1536 is still limited information regarding the clinical and productive condition during the post-vaccination period. This  
1537 lack of data has sometimes been cited as a reason for the decreased vaccination coverage by dairy producers.  
1538 Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of vaccination on local inflammatory response, systemic  
1539 response, and milk production in lactating crossbred dairy cows raised in a tropical climate, using a commercial  
1540 multivalent inactivated vaccine.

1541

## 1542 **3.2. Materials and Methods**

1543

1544

### 1544 **3.2.1 Animals and Study Location**

1545

1546

1547

1548

1549

1550

The prospective study was conducted at three dairy farms located in the Triângulo Mineiro region, two  
farms located in Perdizes (Latitude: 19° 21' 10" S, Longitude 47° 17' 34" W) and one in Guimarães (Latitude:  
18° 50' 4" S, Longitude: 46° 45' 47" W), Minas Gerais, Brazil, from July to August 2020. Farms with similar  
production systems and sanitary management (primovaccinated with inactive multivalent vaccine) were selected.  
The animals were kept in paddocks with shaded areas throughout the study period and were fed a diet composed  
of corn silage, rehydrated corn, protein concentrate, and provided with ad libitum water access.

1551

1552

1553

1554

The selection of animals was based on the following inclusion criteria: crossbred (Gir x Holstein) female  
cows, primiparous or multiparous, lactating, aged between two and eight years, deemed healthy during the clinical  
examination conducted at the time of selection and inclusion (Day -7), and who were vaccinated with an  
inactivated multivalent commercial vaccine (the same as in the study).

1555 **3.2.2. Experimental design**

1556 In order to evaluate the effect of a single vaccination, the animals were initially selected on D-7, at which  
1557 time a clinical examination, assessment of the injection site, and blood collection for complete blood count, total  
1558 proteins, albumin, globulins, and acute-phase proteins such as haptoglobin, ceruloplasmin, acid glycoprotein,  
1559 transferrin, and fibrinogen were performed. During the one-week period from D-7 until the vaccination day (D0),  
1560 the animals underwent acclimatization, and daily milk production (Kg/day) was measured to obtain an individual  
1561 production average. On D0, the animals were vaccinated, and they were monitored for a period of 7 days, with  
1562 assessments conducted at the following time points: a) Rectal temperature measurement: on the day of vaccination  
1563 (D0) and at 24 hours (D+1), 72 hours (D+3), and 168 hours (D+7) after vaccination; b) Evaluation of the injection  
1564 site: on D0 and D+7; c) Blood collection: on D0, D+1, D+3, and D+7.

1565

1566 **3.2.3. Vaccination Management**

1567 On the vaccination day (D0), the animals were immunized (annual revaccination) subcutaneously, on the  
1568 left side including the prescapular region, with a single 5 mL dose of a commercial multivalent inactivated vaccine,  
1569 composed of: a) inactivated viral strains of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), BVDV-1 (5.960) and BVDV-2  
1570 (53.637); b) a thermosensitive strain of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), IBR-1 (RBL106), and  
1571 Parainfluenza type 3 (PI3); c) modified live strain of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV); d) serovars of  
1572 Leptospira including Leptospira canicola, L. grippotyphosa, L. hardjo, L. icterohaemorrhagiae, and L. pomona.  
1573 The vaccine contained Amphigen®, Quil A cholesterol, and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (QAD) as  
1574 adjuvants (Amphigen®/QAD).

1575

1576 **3.2.4. Clinical Examination, Assessment of Injection Site, and Milk Production**

1577 The clinical examination was conducted according Terra e Reynolds (2014) on D-7 to include clinically  
1578 healthy animals, and rectal body temperature was measured on D0, D+1, D+3, and D+7. In addition to these time  
1579 points, all females were inspected daily, and if necessary, a clinical examination was performed.

1580 To observe the vaccine reaction, the injection site was assessed on D0 and D+7. The assessment involved  
1581 inspection and local palpation. Skin measurements were taken on all animals at the vaccination site. The height  
1582 and width of the reactions at the injection site were measured twice consecutively with the aid of a caliper and the  
1583 average was expressed in cm, then transformed into an area (height x width) and expressed in square millimeters  
1584 ( $\text{mm}^2$ ) adapted of (Baccili et al., 2019).

1585 Milk production was evaluated daily in all females, starting from D-7 until the end of the experiment on  
1586 D+7. It was automatically measured using a mechanical milking machine twice a day.

1587

### 1588 ***3.2.5. Blood Collection and Processing of Whole Blood and Serum***

1589 In order to characterize the leukocyte profile and levels of acute-phase proteins, a subset of 9 primiparous  
1590 and 11 multiparous cows were randomly selected. Blood samples were collected via coccygeal venipuncture into  
1591 vacuum tubes with and without anticoagulant to obtain whole blood and serum, respectively. Blood samples were  
1592 collected on days D-7, D0, D+1, D+3, and D+7.

1593 Total leukocyte counts, leukocyte differentials, and platelet counts were determined using an automated  
1594 cell counter (ABC Vet, Horiba ABX®, Montpellier, France). The plasma fibrinogen concentration was measured  
1595 according to Jain's recommendations (1993). Biochemical analyses were performed using an automatic analyzer  
1596 PKL 125® and Labtest Diagnóstica commercial kits. The biochemical elements analyzed in the serum were: a)  
1597 total proteins; b) albumin; c) globulins - calculated as the difference between the total protein and albumin values.

1598

### 1599 ***3.2.6 Protein Profile by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)***

#### 1600 ***Technique***

1601 For protein fractionation of acute phase proteins (Haptoglobin, Ceruloplasmin, Acid glycoprotein and  
1602 transferrin) , the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique was  
1603 employed, following the method described by Laemmli (1970) e Fagliari and Silva (2002).

1604 After fractionation, the gel was stained for 10 minutes in a Coomassie blue solution, consisting of  
1605 methanol (50%), water (40%), glacial acetic acid (9.75%), and Coomassie blue dye (0.25%). Subsequently, the  
1606 gel was placed in a 7% acetic acid solution to remove excess dye until the protein fractions appeared clear. The  
1607 concentrations of these proteins were determined using a computerized densitometer (Shimadzu CS 9301, Tokyo,  
1608 Japan). A marker solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) with molecular weights of 29,000, 45,000, 66,000, 97,400,  
1609 116,000, and 205,000 daltons (Da), as well as purified proteins including albumin, IgG, haptoglobin, and  
1610 transferrin, were used as references.

1611

### 1612 ***3.2.7 Statistical Analysis***

1613 The data was initially tabulated in spreadsheets using Microsoft Excel® software (Microsoft Office 365  
1614 Software, Redmond, WA, USA). For statistical analysis and graph construction, GraphPad Prism 9 software  
1615 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used. The animal factor was considered as the experimental

1616 unit. Descriptive analysis was presented as mean and standard deviation (for quantitative variables) and percentage  
1617 (for qualitative variables).

1618 Comparison of variables was performed considering the values obtained on D-7 as baseline values  
1619 (intragroup evaluation). Initially, the normality of the data was assessed using the Anderson-Darling normality test  
1620 at a significance level of 5%. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test were used for  
1621 variables with normal distribution (parametric variables), and the Friedman test with Dunn's multiple comparison  
1622 post-test were used for variables with non-normal distribution (non-parametric variables). All tests were evaluated  
1623 at a significance level of 5% ( $P < 0.05$ ).

1624

### 1625 3.3. Results

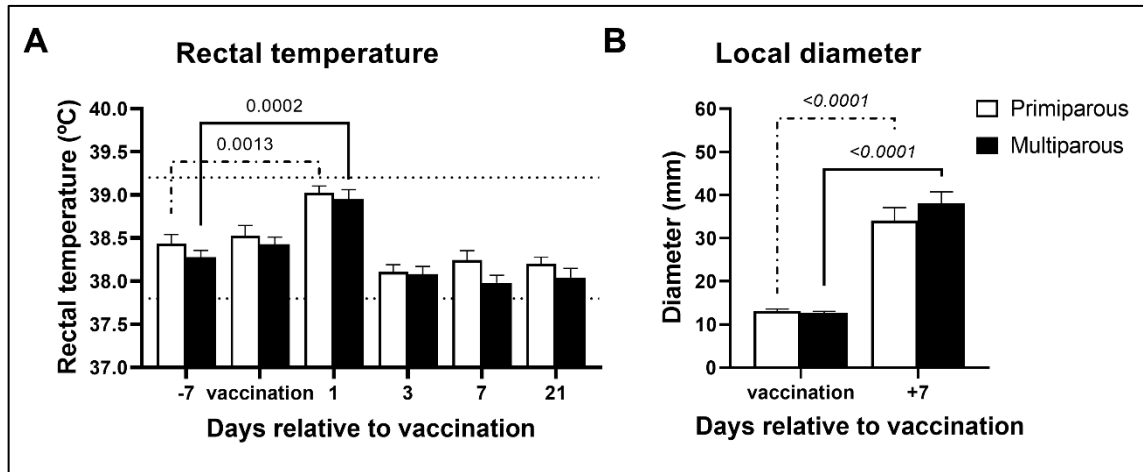
1626 A total of 68 animals were used in the study, with 31 primiparous cows ( $231.1 \pm 117.7$  DIM) and 37  
1627 multiparous cows ( $188.0 \pm 130.7$  DIM). The number of primiparous and multiparous cows selected per property  
1628 was, respectively, 14 ( $208.6 \pm 109.7$  DIM) and 8 ( $185.9 \pm 138.2$  DIM) (Property 1), 8 ( $225.8 \pm 122.8$  DIM) and  
1629 16 ( $208.9 \pm 146.6$  DIM) (Property 2), and 9 ( $270.9 \pm 128.2$  DIM) and 13 ( $163.3 \pm 109.4$  DIM) (Property 3).

1630 In the evaluation of the vaccination effect on rectal temperature (Figure 1), there was a significant increase  
1631 24 hours (D+1) after vaccination compared to D-7, both in primiparous cows ( $P=0.0013$ ) and multiparous cows  
1632 ( $P=0.0002$ ). The mean temperature on D+1 remained within normal values; however, it was observed that 16.1%  
1633 (5/31) of primiparous cows and 29.7% (11/37) of multiparous cows exhibited hyperthermia ( $\geq 39.5$  °C).

1634 In the assessment of the injection site, a significant increase in diameter was observed in both groups  
1635 ( $P < 0.0001$ ) between the day of vaccination and D+7. No changes were observed in other assessments such as local  
1636 temperature, sensitivity, or presence of fistula or abscess at the site.

1637

1638 **Figure 1.** Evaluation of rectal temperature and diameter at the injection site in primiparous and multiparous  
1639 crossbred cows vaccinated with inactivated multivalent vaccine during lactation.



Note: Average of two measurements (height x width) of reactions at the injection site on the left side of the neck.

1640  
1641  
1642

1643

In the leukogram, the vaccination effect occurred only in multiparous cows with an increase in the mean number of total leukocytes ( $P=0.0319$ ) from  $14,350.0 \pm 4,316.9$  cells/ $\mu\text{L}$  (D-7) to  $19,870.0 \pm 4,539.2$  cells/ $\mu\text{L}$  (D+1), and segmented neutrophils ( $P=0.0230$ ) from  $6,177.0 \pm 1,597.2$  cells/ $\mu\text{L}$  (D-7) to  $10,203.9 \pm 3,803.8$  cells/ $\mu\text{L}$  observed 24 hours (D+1) after vaccination (Figure 2). Additionally, no vaccination effect was observed in primiparous and multiparous cows in lymphocytes, band neutrophils, eosinophils, monocytes, and basophils.

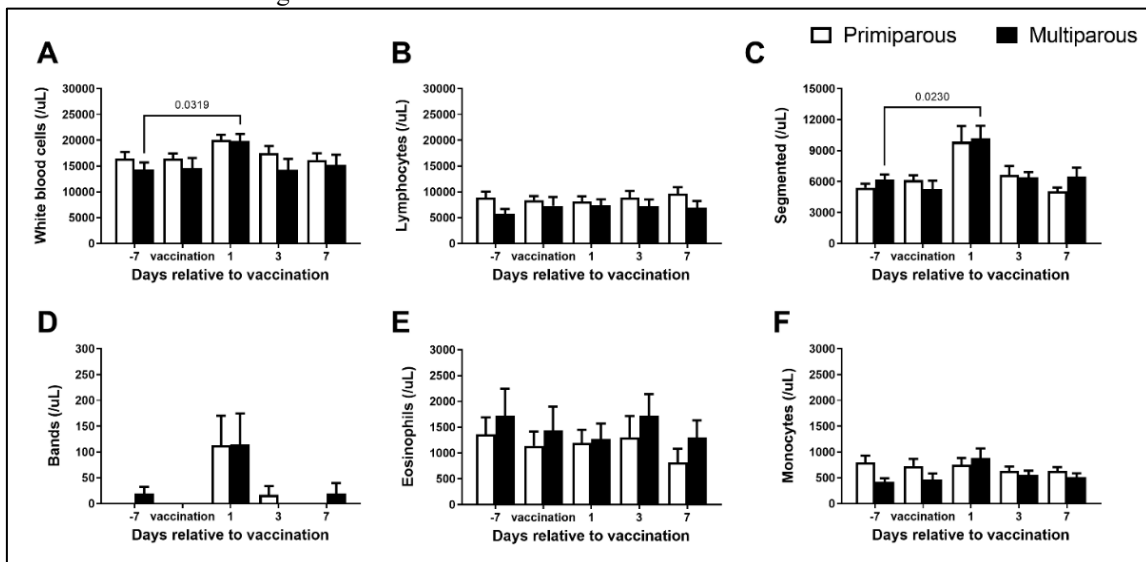
1647

1648

1649

1650

**Figure 2.** Evaluation of leukogram in primiparous and multiparous crossbred cows vaccinated with inactivated multivalent vaccine during lactation.



1651  
1652

1653

In the evaluation of total proteins and their fractions albumin and globulins (Figure 3), a significant difference was observed in the concentrations of multiparous cows on D+7 ( $7.35 \pm 0.46$  g/dL) compared to D-7 ( $6.59 \pm 0.66$  g/dL). In primiparous cows, there were no changes in the concentration of total proteins, albumin, and globulins.

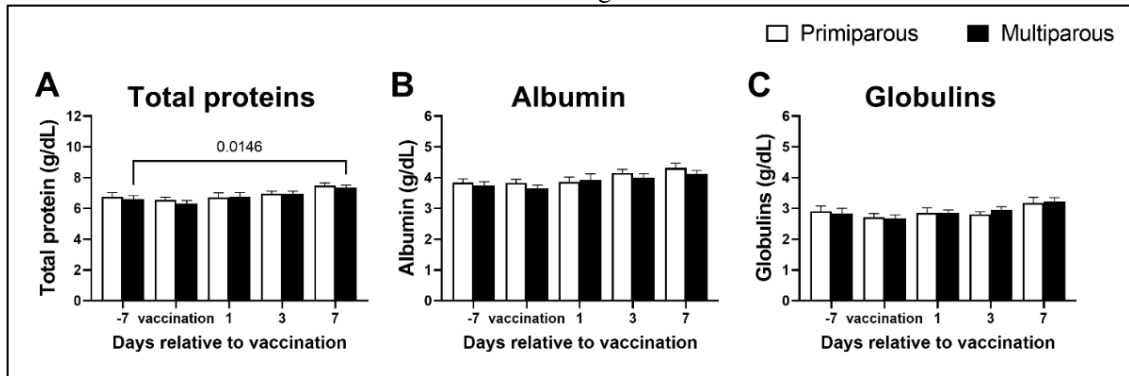
1654

1655

1656

1657

1658 **Figure 3.** Evaluation of total proteins, albumin, and globulins in serum of primiparous and multiparous crossbred  
 1659 cows vaccinated with inactivated multivalent vaccine during lactation.



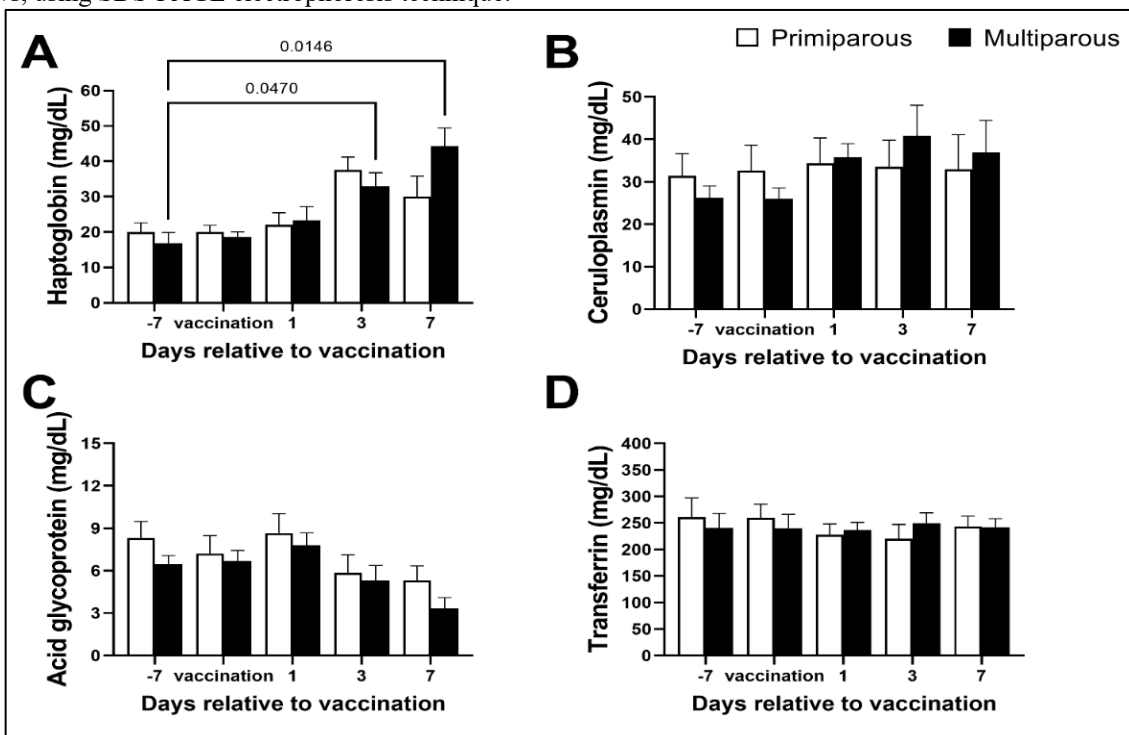
1660

1661

1662 In the acute-phase proteins serum evaluation (Figure 4), for multiparous cows, the mean values of  
 1663 haptoglobin were higher on D+3 (P=0.0470) and D+7 (P=0.0146) compared to D-7. There was no difference in  
 1664 serum concentrations of ceruloplasmin, acid glycoprotein, and transferrin in both primiparous and multiparous  
 1665 cows. In Figure 5, it was observed that fibrinogen significantly increased on D+3 for both primiparous (P=0.0101)  
 1666 and multiparous cows (P=0.0104).

1667

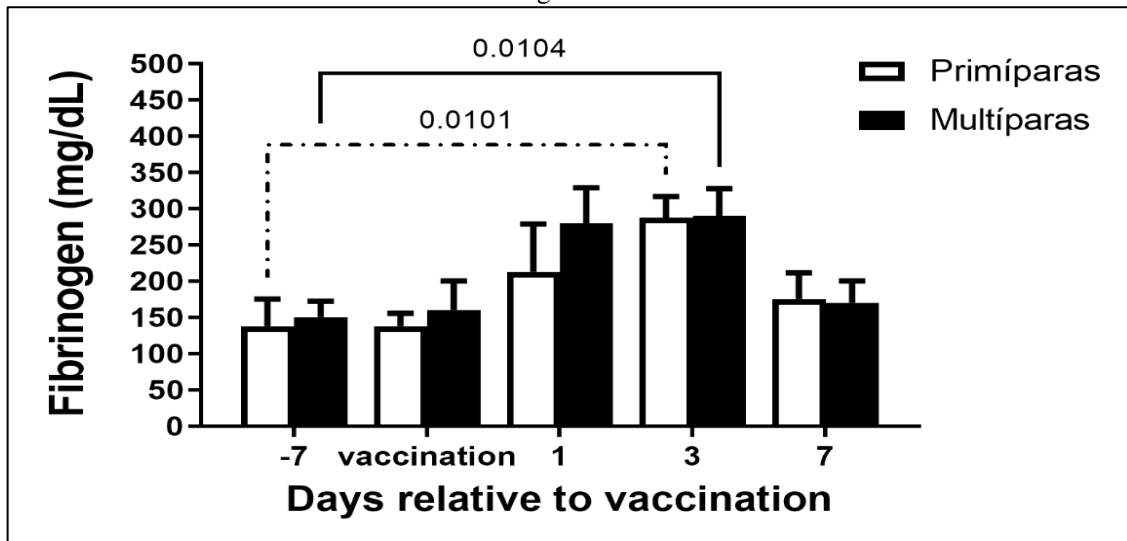
1668 **Figure 4.** Effect of vaccination with inactivated multivalent vaccine on the values of acute phase proteins  
 1669 haptoglobin, ceruloplasmin, acid glycoprotein, and transferrin in primiparous and multiparous lactating crossbred  
 1670 cows, using SDS-PAGE electrophoresis technique.



1671



1672 **Figure 5.** Evaluation of plasma fibrinogen concentration in primiparous and multiparous crossbred cows  
 1673 vaccinated with inactivated multivalent vaccine during lactation.



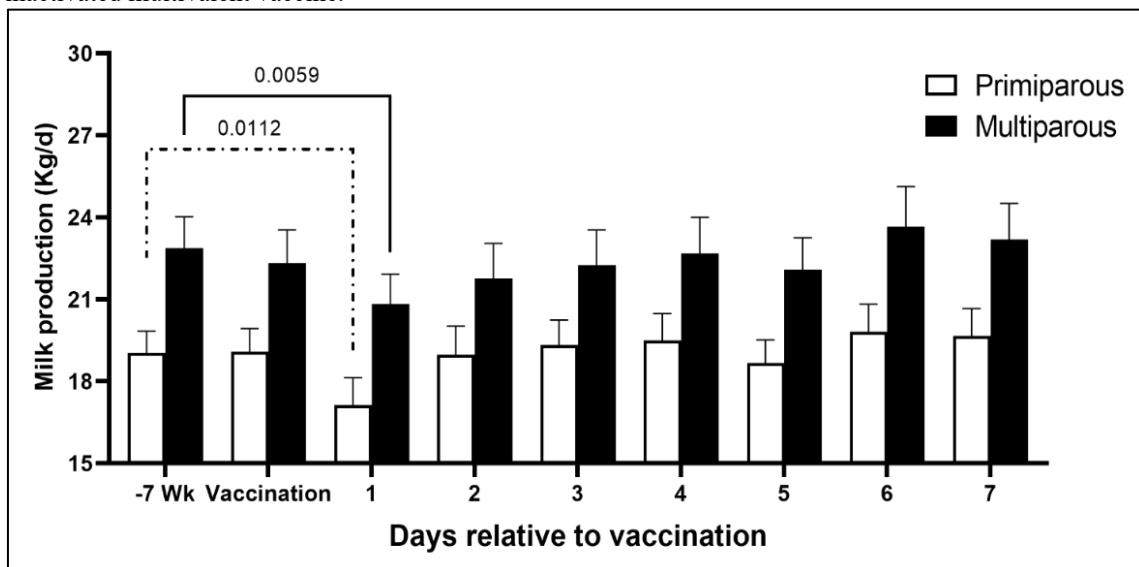
1674

1675

1676 There was a significant reduction in the average milk production in both primiparous and multiparous  
 1677 cows at 24 hours after vaccination (D+1) compared to the average milk production before vaccination (D-7 to D0).  
 1678 In primiparous cows, this reduction was 10.0%, from  $19.0 \pm 4.2$  L/day to  $17.1 \pm 5.3$  L/day. In multiparous cows,  
 1679 the reduction was 9.2%, from  $22.9 \pm 6.8$  L/day to  $20.8 \pm 6.5$  L/day.

1680

1681 **Figure 6.** Evaluation of milk production in primiparous and multiparous crossbred cows vaccinated with  
 1682 inactivated multivalent vaccine.



1683

1684

### 1685 3.4. Discussion

1686 This study shows the effect of vaccination in primiparous and multiparous crossbred (Gir x Holstein)  
 1687 cows with an inactivated multivalent vaccine during lactation. It was observed that vaccination induced a local

1688 reaction in both primiparous and multiparous cows, with an increase in the injection site, as well as an increase in  
1689 plasma fibrinogen concentrations. However, systemic inflammatory effects, such as increased total leukocytes,  
1690 segmented neutrophils, and haptoglobin, occurred only in multiparous cows. The systemic inflammatory response  
1691 induced by vaccination reduced milk production in the assessment conducted 24 hours after vaccination in both  
1692 groups.

1693 In the literature reviewed, this study is the first to evaluate the effect of vaccination with inactivated  
1694 multivalent vaccine in primiparous and multiparous crossbred (Gir x Holstein) cows during lactation, under  
1695 management and tropical climate conditions. The results of this research contribute to understanding the post-  
1696 vaccination impact on local and systemic inflammatory levels, as well as the effects on milk production 24 hours  
1697 after vaccination.

1698 In the evaluation conducted 24 hours after vaccination, the observed increase in temperature can be  
1699 interpreted as a common systemic physiological reaction following the administration of many vaccines  
1700 (Gethmann et al., 2009; Smith et al., 2023). This rise in rectal temperature occurs during an acute-phase response  
1701 to vaccination (Hughes et al., 2017). Transient increases in body temperature in Holstein cows, with peaks at 12  
1702 to 24 hours, have been reported with the use of commercial inactivated multivalent vaccines (BHV1, BVDV, PI-  
1703 3V, BRSV, and *Leptospira spp.* serovars) (Scott et al., 2001), with Coxevac<sup>®</sup> vaccine (Schulze et al., 2016) and in  
1704 Holstein heifers vaccinated with antigenic formulation and adjuvants similar to those used in the present study,  
1705 after primary immunization and booster (Baccili et al., 2019).

1706 During the study, it was observed that the reaction at the injection site, characterized by swelling, occurred  
1707 in both primiparous and multiparous cows. Reactogenicity may be a consequence of the activation of the innate  
1708 immune response induced by the adjuvant at the injection site (Ridpath et al., 2010; Di Pasquale et al., 2015). This  
1709 local inflammatory response has been described in Holstein heifers, which exhibited local reactions of 30 and 61  
1710 mm<sup>2</sup> at 24 hours after primary and secondary immunization, respectively (Baccili et al. (2019). Similar data has  
1711 also been reported in lactating Holstein cows vaccinated against different antigens and adjuvant formulations, with  
1712 the use of vaccines against gram-negative bacteria (Scott et al., 1998), the commercial vaccine Coxevac<sup>®</sup> (Schulze  
1713 et al., 2016) and foot-and-mouth disease (Robattini et al., 2020).

1714 Multiparous cows showed a greater response in the leukogram, with a significant increase in the mean  
1715 count of leukocytes and segmented neutrophils, but without an increase in total bands 24 hours after vaccination.  
1716 Polymorphonuclear cells (neutrophils, basophils, and eosinophils), evaluated in this study, contribute to the innate

1717 immune response because they contain receptors to interact with specific cells, antibodies, and cytokines released  
1718 during the immune response process (Paape et al., 2003).

1719 In this research, an inactivated multivalent vaccine was used, against multiple strains of viral antigens,  
1720 bacterial serovars, and adjuvants. This combination can act on immunostimulation and white blood cell count, as  
1721 already reported in human infant vaccines (Prentice et al., 2018). Baccili et al. (2019) observed an increase in white  
1722 blood cell count, characterized by leukocytosis with neutrophilia, lymphopenia, monocytosis, and eosinophilia, 24  
1723 hours after booster vaccination of dairy heifers against antigens similar to those used in this study.

1724 It was observed that multiparous cows presented leukocytosis with neutrophilia without alterations in the  
1725 other types of white blood cells, suggesting the participation of neutrophils as indicators of the innate immune  
1726 response (Paape et al., 2003). Neutrophils actively participate in the rapid-response action of the innate immune  
1727 system (Paape et al., 2003; Leach et al., 2013) by being recruited to the vaccination site before other myeloid cells.

1728 The increase in haptoglobin was observed only in multiparous cows, which could indicate the influence  
1729 of inflammatory effects in the post-vaccination period (Cooke and Arthington, 2013; Baccili et al., 2019; Hudson  
1730 et al., 2020). Similar to this study, increases in haptoglobin concentrations were reported in dairy heifers 24 and  
1731 48 hours after the application of an inactivated multivalent vaccine (Baccili et al., 2019), in beef steers (Angus x  
1732 Hereford) with increases on days 3, 5, and 7 after the application of a modified live and inactivated pentavalent  
1733 respiratory vaccine against (BVDV 1 and 2, IBR, PI3, and BRSV) (Hudson et al., 2020).

1734 In this study, a significant increase in fibrinogen was observed in both primiparous and multiparous cows  
1735 after vaccination. Fibrinogen is a positive acute-phase protein, and its elevation may have occurred in response to  
1736 vaccination-mediated inflammation. In this study, both primiparous and multiparous cows showed peaks in protein  
1737 concentrations 72 hours after immunization, within the 1-3 day range following the onset of inflammation, as  
1738 reported in the literature (Bagga et al., 2016).

1739 Vaccination led to a reduction in milk production in both primiparous and multiparous cows, with losses  
1740 of 10% and 9.2%, respectively. Decreased milk production can occur post-vaccination as part of the innate immune  
1741 response, tending to be more pronounced in high-producing cows with multiple lactations (Scott et al., 2001;  
1742 Schulze et al., 2016). Similar findings were presented by Bergeron and Elsener (2008) where Dutch cows  
1743 vaccinated against similar antigens and adjuvants as in this study showed a significant decrease in milk production  
1744 from 24 to 72 hours post-vaccination.

1745 The same effect was described in Dutch cows vaccinated with inactivated multivalent vaccines (Scott et  
1746 al., 2001) and against *Coxiella burnetii*, with losses during the first seven days post-vaccination (Schulze et al.,

1747 2016). However, some studies differed from our results by not observing differences in milk production, both for  
1748 primiparous and multiparous cows vaccinated with the same strains of modified live and inactivated multivalent  
1749 (BVDV, IBR, PI3, and BRSV) viruses (Dubovi et al., 2000).

1750 Therefore, the results of this study suggest that vaccination induces a short-term acute-phase response,  
1751 more prominent in multiparous crossbred cows that received the inactivated multivalent vaccine, with occasional  
1752 reductions in milk production.

1753

#### 1754 **Acknowledgments**

1755 The authors are grateful to the farmers and veterinarians involved in the clinical examinations and data collection.

1756

#### 1757 **Funding**

1758 This research was funded by FAPEMIG, grant number APQ-00332-17

1759

#### 1760 **Declaration of Competing Interest:**

1761 The authors declare no conflict of interest.

1762

#### 1763 **Ethics approval**

1764 Está pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de  
1765 Uberlândia com o protocolo n° 104/19.

1766

#### 1767 **Author Contributions**

1768 Conceptualization, J.S. and V.B.; methodology, J.S., V.B., and B.S.; formal analysis, J.S., B.S., and V.B.;  
1769 investigation, V.B., D.P., A.N., and L.M.; resources, J.S., and V.B.; data curation, J.S.; writing—original draft  
1770 preparation, B.S., L.M., and J.S.; writing—review and editing, B.S., L.M., and J.S.; supervision, V.B. and J.S.;  
1771 project administration, J.S. and V.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

1772

#### 1773 **Data Availability**

1774 Further information on the data and methodologies will be made available by the author for correspondence, as  
1775 requested.

1776

1777 **References**

- 1778 Baccili, C.C., Martin, C.C., Decaris, N., Madureira, K.M., Chase, C. and Gomes, V., 2019. Effects of 3 different  
1779 commercial vaccines formulations against BVDV and BHV-1 on the inflammatory response of holstein  
1780 heifers *Veterinary Sciences*, 6 (MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute).  
1781 DOI:10.3390/vetsci6030069
- 1782 Bergeron, R. and Elsener, J., 2008. Comparison of postvaccinal milk drop in dairy cattle vaccinated with one of  
1783 two different commercial vaccines. *Vet. Ther*, 9, 141–146. PMID: 18597252
- 1784 Castrucci, G., Frigeri, F., Salvatori, D., Ferrari, M., Sardonini, Q., Cassai, E., Lo Dico, M., Rotola, A. and  
1785 Angelini, R., 2002. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value  
1786 of eight vaccines *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 25, 29–41. DOI:  
1787 10.1016/s0147-9571(01)00017-0
- 1788 Cooke, R.F. and Arthington, J.D., 2013. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA  
1789 or a colorimetric method based on peroxidase activity *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*,  
1790 97, 531–536. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2012.01298.x
- 1791 De Brun, L., Leites, M., Furtado, A., Campos, F., Roehe, P. and Puentes, R., 2021. Field evaluation of  
1792 commercial vaccines against infectious bovine rhinotracheitis (Ibr) virus using different immunization  
1793 protocols *Vaccines*, 9, 1–11. DOI: 10.3390/vaccines9040408
- 1794 Di Pasquale, A., Preiss, S., Da Silva, F.T. and Garçon, N., 2015. Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and  
1795 beyond *Vaccines*, 3, 320–343 (MDPI). DOI: 10.3390/vaccines3020320
- 1796 Dubovi, E.J., Gröhn, Y.T., Brunner, M.A. and Hertl, J.A., 2000. Response to modified live and killed multivalent  
1797 viral vaccine in regularly vaccinated, fresh dairy cows. *Veterinary therapeutics: research in applied  
1798 veterinary medicine*, 1, 49–58. PMID: 19757565
- 1799 Fagliari, J.J. and Silva, S.L., 2002. Hemogram and plasma proteins of healthy horses and horses with acute  
1800 abdomen before and after laparotomy *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 54, 559–  
1801 567 (Universidade Federal de Minas Gerais).
- 1802 Francis, M.J., 2018. *Recent Advances in Vaccine Technologies* (W.B. Saunders). DOI:  
1803 10.1016/j.cvsm.2017.10.002
- 1804 Gethmann, J., Hüttner, K., Heyne, H., Probst, C., Ziller, M., Beer, M., Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C. and  
1805 Conraths, F.J., 2009. Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle  
1806 under field conditions *Vaccine*, 27, 4118–4126. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.072
- 1807 Hudson, R.E., Tomczak, D.J., Kaufman, E.L., Adams, A.M., Carroll, J.A., Broadway, P.R., Ballou, M.A. and  
1808 Richeson, J.T., 2020. Immune responses and performance are influenced by respiratory vaccine antigen  
1809 type and stress in beef calves *Animals*, 10, 1–17 (MDPI AG). DOI: 10.3390/ani10071119
- 1810 Hughes, H.D., Carroll, J.A., Burdick Sanchez, N.C., Roberts, S.L., Broadway, P.R., May, N.D., Ballou, M.A. and  
1811 Richeson, J.T., 2017. Effects of dexamethasone treatment and respiratory vaccination on rectal temperature,  
1812 complete blood count, and functional capacities of neutrophils in beef steers *Journal of Animal Science*, 95,  
1813 1502–1511 (American Society of Animal Science). DOI: 10.2527/jas.2017.1374
- 1814 Khalil, R.H. and Al-humadi, N., 2020. Types of acute phase reactants and their importance in vaccination (  
1815 Review) 143–152. DOI: 10.3892/br.2020.1276
- 1816 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4  
1817 *NATURE*, 227. DOI: 10.1038/227680a0
- 1818 Leach, R.J., Chitko-McKown, C.G., Bennett, G.L., Jones, S.A., Kachman, S.D., Keele, J.W., Leymaster, K.A.,  
1819 Thallman, R.M. and Kuehn, L.A., 2013. The change in differing leukocyte populations during vaccination  
1820 to bovine respiratory disease and their correlations with lung scores, health records, and average daily gain  
1821 *Journal of Animal Science*, 91, 3564–3573. DOI: 10.2527/jas.2012-5911

- 1822 Newcomer, B.W., Walz, P.H., Givens, M.D. and Wilson, A.E., 2015. Efficacy of bovine viral diarrhea virus  
1823 vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis *Theriogenology*, 83, 360-365.e1 (Elsevier  
1824 Inc). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.028
- 1825 Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X. and Lee, J.W., 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in  
1826 blood and milk *Veterinary Research*, 34, 597–627. DOI: 10.1051/vetres:2003024
- 1827 Platt, R., Coutu, C., Meinert, T. and Roth, J.A., 2008. Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent  
1828 killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle *Veterinary Immunology and Immunopathology*,  
1829 122, 8–15. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.11.009
- 1830 Prentice, S., Kamushaaga, Z., Nash, S.B., Elliott, A.M., Dockrell, H.M. and Cose, S., 2018. Post-immunization  
1831 leucocytosis and its implications for the management of febrile infants *Vaccine*, 36, 2870–2875 (Elsevier  
1832 Ltd)
- 1833 Ridpath, J.F., 2013. Immunology of BVDV vaccines *Biologicals*, 41, 14–19 (Elsevier Ltd). DOI:  
1834 10.1016/j.biologicals.2012.07.003
- 1835 Ridpath, J.F., Dominowski, P., Mannan, R., Yancey, R., Jackson, J.A., Taylor, L., Mediratta, S., Eversole, R.,  
1836 MacKenzie, C.D. and Neill, J.D., 2010. Evaluation of three experimental bovine viral diarrhea virus killed  
1837 vaccines adjuvanted with combinations of Quil A cholesterol and dimethyldioctadecylammonium (DDA)  
1838 bromide *Veterinary Research Communications*, 34, 691–702. DOI: 10.1007/s11259-010-9442-x
- 1839 Robattini, J.A., Kumer, R.M., Velho, G.S., Buttelli, M.M., Soares, Á.C., Corbellini, L.G. and Dalto, A.G.C.,  
1840 2020. Adverse effects of foot-and-mouth disease vaccine in dairy cattle *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 40,  
1841 589–592 (Colegio Brasileiro de Patologia Animal).
- 1842 Schulze, L.S.C., Borchardt, S., Ouellet, V. and Heuwieser, W., 2016. Effect of a phase I *Coxiella burnetii*  
1843 inactivated vaccine on body temperature and milk yield in dairy cows *Journal of Dairy Science*, 99, 541–  
1844 550 (Elsevier Inc.). DOI: 10.3168/jds.2015-9628
- 1845 Scott, H.M., Atkins, G., Willows, B. and McGregor, R., 2001. Effects of 2 commercially-available 9-way killed  
1846 vaccines on milk production and rectal temperature in Holstein-Friesian dairy cows. *The Canadian*  
1847 *Veterinary Journal*, 42, 793–798. PMID: PMC1476582
- 1848 Scott, H.M., Sargeant, J.M., Ireland, M.J., Lissemore, K.D., Leslie, K.E., Kelton, D.F. and Mallard, B.A., 1998.  
1849 Effects of a core antigen vaccine against gram-negative bacteria on physiologic and yield parameters of  
1850 dairy cows during late lactation and the dry period. *Journal. Dairy Science*, 81, 1928–1935. DOI:  
1851 10.3168/jds.S0022-0302(98)75765-0
- 1852 Smith, M.A., Kristula, M.A., Aceto, H. and Levine, D.G., 2023. Acute Phase Protein Response in Native and  
1853 Imported Horses After Routine Combination Vaccination Protocol *Journal of Equine Veterinary Science*,  
1854 126 (W.B. Saunders). DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104497
- 1855 Su, N., Wang, Q., Liu, H.-Y., Li, L.-M., Tian, T., Yin, J.-Y., Zheng, W., Ma, Q.-X., Wang, T.-T., Li, T., Yang,  
1856 T.-L., Li, J.-M. and Diao, N.-C., 2023. Prevalence of bovine viral diarrhea virus in cattle between 2010 and  
1857 2021: A global systematic review and meta-analysis *Frontiers in Veterinary Science*. DOI:  
1858 10.3389/fvets.2022.1086180
- 1859 Terra, R.L. and Reynolds, J.P., 2014. Ruminant history, physical examination, welfare assessment, and records  
1860 In: B. P. Smith (ed), *Large animal internal medicine*, (Elsevier Mosby), 52–63
- 1861 • Walz, P.H., Chamorro, M.F., M. Falkenberg, S., Passler, T., van der Meer, F. and R. Woolums, A.,  
1862 2020. Bovine viral diarrhea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine  
1863 consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination *Journal of*  
1864 *Veterinary Internal Medicine*, 34, 1690–1706. DOI: 10.1111/jvim.15816