

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**IMUNOFENOTIPAGEM E AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE
LINFÓCITOS CIRCULANTES DE BOVINOS DA RAÇA
CURRALEIRO**

Júlia de Miranda Moraes

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

GOIÂNIA
2008



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Júlia de Miranda Moraes		
CPF:	991089501-30	E-mail:	mmjulia_vet@yahoo.com.br
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	CNPJ:
Título:	Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça Curraleiro		
Palavras-chave:	Imunocitoquímica, CD3, LB, leucócitos, pé-duro, perfil imunológico, leucograma		
Título em outra língua:	Immunophenotyping and quantitative assessment of circulating lymphocytes of the breed of Curraleiro cattle		
Palavras-chave em outra língua:	Immunocytochemistry, CD3, LB, leukocytes, immunological profile, leucogram		
Área de concentração:	Patologia, Clínica e Cirurgia Animal		
Data defesa:	03/03/2008		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal		
Orientador(a):	Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito		
CPF:	087716181-04	E-mail:	labbrito@vet.ufg.br
Co-orientador(a):	Maria Clorinda Soares Fioravanti		
CPF:	370994261-68	E-mail:	clorinda@vet.ufg.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

JÚLIA DE MIRANDA MORAES

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

**IMUNOFENOTIPAGEM E AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE
LINFÓCITOS CIRCULANTES DE BOVINOS DA RAÇA
CURRALEIRO**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária da
Universidade Federal de
Goiás

Área de Concentração:
Patologia, Clínica e Cirurgia

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

Comitê de orientação:

Prof.^a Dr^a Maria Clorinda Soares Fioravanti

Prof.^a Dr^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Moraes, Júlia de Miranda.

M827i Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça curraleiro [manuscrito] / Júlia de Miranda Moraes. – 2008.
xvii,73 f. il. : color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito.

Co-Orientadores Prof^a Dr^a Maria Clorinda Soares Fioravanti e Prof^a Dr^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia: f. 53-66.

Inclui listas de figuras, tabelas e quadros e de abreviaturas e símbolos.

Anexos.

1. Bovino – Raça [curraleiro]- Resistência a doenças 2. Bovino – Perfil imunológico 3. Bovino - Imunocitoquímica 4. Bovino – Leucócito I. Brito, Luiz Augusto Batista. II. Fioravanti, Maria Clorinda Soares. III. Moura, Veridiana Maria Brianezi Dignani de. IV. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária V. Título.

CDU : 619:616:636.2

JÚLIA DE MIRANDA MORAES

Dissertação defendida e aprovada em **03/03/2008**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito
(ORIENTADOR (A))

Profa. Dra. Reneé Laufer Amorim – UNESP/Botucatu/SP

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno – EV/UFG

Dedico, primeiramente, aos meus pais Antônio Assis e Maria Izeth de Miranda, pela confiança em mim depositada; aos meus irmãos Lucia de Miranda e Valter Assis pelo amor incondicional; ao Bruno L. Vieira pela paciência e amor em todos os momentos; aos meus professores e amigos por todo o apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter sempre iluminado meu caminho, ter me confortado nos momentos difíceis e ter me dado forças para superar as dificuldades;

Aos meus pais por todos os ensinamentos e exemplos que me deram, os quais foram os responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional;

Aos meus irmãos Lúcia e Valter, para os quais tenho profundo amor e dedicação, mesmo este não estando presente em matéria, são as principais pessoas ao meu lado.

Aos meus sobrinhos Antônio Neto e Maria Eduarda, pela alegria proporcionada em todos os dias de nossas vidas.

Ao meu amigo e companheiro Bruno Lucas Vieira, por todos esses anos de amor, apoio, dedicação e harmonia.

À minha mais recente “irmã” Gabriela Henrique de Moraes, que tem iluminado e alegrado nossos dias.

À Valácia Lobo e Murilo Lobo, pelo companheirismo e ajuda sempre que necessário.

À minha família, pela união e apoio em todos os anos.

À Universidade Federal de Goiás, à Escola de Veterinária, à coordenação de pós-graduação por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito, por ter-me aceitado como orientanda, pelos valiosos ensinamentos, preocupação, paciência e apoio durante os anos de orientação e convivência. Obrigada pelo seu carinho paterno e pelo exemplo de vida e de pessoa que tem me transmitido a cada dia.

Às minhas co-orientadoras Maria Clorinda Soares Fioravanti e Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, pela oportunidade a mim concedida de realização deste trabalho, pelo carinho e atenção, esclarecimentos nos momentos de dúvidas e auxílio inigualável para execução deste projeto.

Obrigada pelos bons momentos de convívio e importantes acréscimos em meu aprimoramento profissional, mas acima de tudo, no crescimento pessoal.

À Raquel Juliano Soares pela confiança de execução deste trabalho.

À minha amiga Marina Pacheco Miguel, que me abriu os olhos para a área acadêmica, sem a qual eu não estaria concluindo este curso. Obrigada por sua amizade, por seus ensinamentos e ajuda prestada neste período.

Às minhas grandes amigas Alinne Cardoso Borges, Aline Maria Vasconcelos de Lima, Beatriz Peixoto Ramos, Flávia Gontijo de Lima, Liliana Borges de Menezes, Lízia Ludmila Lima Figueiredo, Suzamar Cardinal e Úrsula Nunes Rauecker pela amizade fiel e sincera e atenção em todos os momentos. Agradeço infinitamente toda preocupação que tiveram comigo nas fases tortuosas desses anos e pelas palavras de animo e entusiasmo que sempre me ofereceram.

Aos participantes do projeto Carolina dos Santos Ribeiro, Diogo Di Francescantonio Andrade, Gustavo Lage Costa, Joyce Rodrigues Lobo, Lucas Jacomini Abud, Marlon Alves de Pádua Filho e Victor Yunes Guimarães, por toda ajuda prestada durante a colheita e processamento das amostras, sem os quais, indubitavelmente, não seria possível o término do experimento.

Ao José Reinaldo Fioravanti Filho, pelo grande auxílio durante a segunda colheita, sem o qual não teria sido realizada com sucesso.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Helton Freires Oliveira e Wesley Francisco Neves pela paciência, disposição e sincera amizade.

Aos amigos Andréia Vitor Couto do Amaral, Carlos Eduardo Fonseca Alves, Hugo Henrique Ferreira, Leandro Guimarães Franco, Leila Maria Leal, Marcelo Seixo de Brito e Silva, Mônica Rodrigues Ferreira, Tatyane Penha Sales, por toda ajuda e amizade que prestaram durante esses anos de excelente convivência.

Aos professores e amigos Adilson Donizeti Damasceno, Ana Paula Iglesias Santin, Moema Pacheco Chediak Matos, Regiani Nascimento Gagno Porto e Rosângela Oliveira Alves pela convivência, atenção e amizade a mim dispensada.

Ao técnico Antônio Souza da Silva pela excelente convivência e ajuda para a realização deste trabalho.

Ao professor Francisco de Carvalho Dias Filho e ao Médico Veterinário Apóstolo Ferreira Martins, pelas palavras sábias e animadoras e por todos os conselhos.

Ao secretário da pós-graduação Gerson Luiz Barros por sempre ter me recebido com atenção, presteza e carinho.

Aos proprietários, Gustavo Alberto Izac Pinto da Fazenda Rio do Peixe e Salviano Antônio Guimarães Borges da Fazenda Araras, que nos cederam a oportunidade das colheitas.

Aos bovinos Curraleiros que permitiram a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Ministério da Integração Nacional (MI) pelo financiamento concedido ao projeto Curraleiros.

“Nessa hora e meia, a gente vai falando do jeito da gente. Os tempos da ingenuidade. Da desatenção. Do não saber de nada. Do susto que se tomou ao se conhecer quase nada. Dos tempos da quixotada. Dos restos do amorismo. Do amadurecimento. Da raiva. Essas coisas todas que foram transformando a gente. Que hoje tem o mesmo riso, faz a mesma algazarra, gosta de cachaça, etc... Mas, que melhorou o jogo de cintura, aprimorou o físico, desenvolveu o faro. Além de ter aprendido a prender a respiração quando o cheiro não é dos melhores. O concerto é isso aí. Devagarinho vai se levando. Pra no final, a esperança ser posta na berlinda, de novo. Esperança de vida nova. Esperança que pinta, mas já com a certeza de que a gente tem que cavar. Tem que tomar. Na marra. Rindo. Se possível.”

Elis Regina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Retrospectiva do Curraleiro no Brasil.....	3
2.2 Sistema imune: características gerais.....	8
2.2.1 Linfócitos.....	9
a) Linfócitos T.....	12
b) Linfócitos B.....	15
2.3 Fatores que podem influenciar os valores leucocitários em bovinos....	17
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Local de colheita das amostras.....	21
4.2. População avaliada.....	21
4.3 Avaliação clínica.....	22
4.4 Exames laboratoriais e imunocitoquímicos.....	22
4.4.1 Local.....	22
4.4.2 Colheita das amostras de sangue.....	22
4.4.3 Hematologia.....	23
4.4.4 Imunocitoquímica.....	24
4.5 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Imunocitoquímica.....	29
5.2 Quantificações imunocitoquímica de linfócitos T e B circulantes em valores percentuais e absolutos.....	34
5.2.1 Valores percentuais.....	34
5.2.2 Valores absolutos.....	37
6 DISCUSSÃO.....	42
6.1 Imunocitoquímica.....	42
6.2 Quantificações imunocitoquímica de linfócitos T e B circulantes em valores percentuais e absolutos.....	45
7 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

ANEXOS..... 67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Exemplares de bovinos da raça Curraleiro, do município de Cavalcante-GO, com características zootécnicas próprias da raça.....	5
FIGURA 2	Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino tipo franja. A: Recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria (ICQ, LCTB16A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 200x). B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, panela de pressão (ICQ, LCTB16A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x). Observar ausência de marcação e intensa coloração de fundo em A e B.....	29
FIGURA 3	Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino tipo <i>squash</i> . A: Recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria, MM1A. B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria, LCTB16A. Observar ausência de marcação e intensa coloração de fundo em A e B. ICQ, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 200x.....	30
FIGURA 4	Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino a partir da papa de leucócitos. A: Recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x). B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 1000x). Observar intensa coloração de fundo em A e B.....	31
FIGURA 5	Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino a partir da papa de leucócitos. A: Ausência de recuperação antigênica (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 1000x). B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x). Observar intensa marcação inespecífica em A e discreta coloração de fundo em B.....	32
FIGURA 6	Fotomicrografia de amostras confeccionadas com sangue de bovinos diluídos em Líquido de Türk. A: Linfócito marcado pelo anticorpo monoclonal MM1A (setas vermelhas). B: Linfócito marcado pelo anticorpo monoclonal LCTB16A (seta vermelha). ICQ, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 1000x....	33
FIGURA 7	Ilustração macroscópica das lâminas citológicas preparadas pelas diferentes técnicas, com as amostras de esfregaço sanguíneo – T1, <i>squash</i> – T2, homogeneização da papa de leucócitos – T3/T4 e diluição em Líquido de Türk – T5.....	33

FIGURA 8	Porcentagens de células marcadas pelos anticorpos anti-CD3 e anti-LB, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, nas diferentes faixas etárias de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.....	35
FIGURA 9	Representação gráfica do número de leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, nas diferentes faixas etárias de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.....	39
FIGURA 10	Representação gráfica do número de leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de acordo com o sexo de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.....	40

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	Valores médios, desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (cv) dos percentuais de linfócitos T e B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica de 116 bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.....	34
TABELA 2	Valores médios, desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos percentuais de linfócitos T e B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro, conforme a faixa etária –Goiânia, 2008.....	35
TABELA 3	Valores médios, desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos percentuais de linfócitos T e B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica de bovinos sadios da raça Curraleiro, em função do sexo – Goiânia, 2008.....	36
TABELA 4	Valores médios, desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos percentuais de linfócitos T e B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro, em função das propriedades – Goiânia, 2008.....	37
TABELA 5	Valores médios, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (cv) dos leucócitos (/μL), linfócitos totais (/μL), linfócitos T (/μL) e linfócitos B (/μL), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de 116 bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.....	37
TABELA 6	Valores médios, desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos leucócitos (/μL), linfócitos totais (/μL), linfócitos T (/μL) e linfócitos B (/μL), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro, conforme a faixa etária – Goiânia, 2008.....	38
TABELA 7	Valores médios, desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos leucócitos (/μL), linfócitos totais (/μL), linfócitos T (/μL) e linfócitos B (/μL), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de bovinos sadios da raça Curraleiro, em função do sexo – Goiânia, 2008.....	39
TABELA 8	Valores médios, desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos leucócitos (/μL), linfócitos totais (/μL), linfócitos T (/μL) e linfócitos B (/μL), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de bovinos sadios da	

	raça Curraleiro, em função das propriedades – Goiânia, 2008.....	41
QUADRO 1	Caracterização dos grupos experimentais de acordo com o sexo, a idade e a origem dos animais.....	21
QUADRO 2	Diluições utilizadas dos anticorpos anti-CD3 (anti-panT) e anti-LB (anti-panB).....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BCR	Receptores de antígeno das células B
BSA	Soro albumina bovina
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAB	diaminobenzidina-peroxidase
EDTA	Ácido etilediaminotetracético
H ₂ O ₂	Água oxigenada
ICQ	Imunocitoquímica
Ig	Imunoglobulina
LB	Linfócito B
LSAB	complexo streptoavidina-biotina-peroxidase
LT	Linfócito T
LTc	Linfócito T citotóxico
LTh	Linfócito T auxiliar
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NK	Células natural killer
rpm	Rotações por minuto
TCR	Receptores de antígeno das células T
TRIS	Trizma base
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
μl	Microlitros

RESUMO

O gado Curraleiro é extremamente dócil, resistente às doenças e parasitas, que pode ser utilizado, sem grandes investimentos na exploração de pastagens naturais de baixa qualidade onde outras raças teriam baixa produtividade ou até mesmo dificuldades de sobrevivência. Todo esse potencial genético encontra-se em sério risco de extinção, uma vez que esses animais vêm sendo substituídos por outros com maior produtividade. A resistência do Curraleiro às enfermidades é popularmente conhecida e divulgada, porém desconhece-se por completo a fisiologia do sistema imunológico desses animais. Estas características são notáveis justificativas para conservar este recurso genético potencialmente importante. Assim, este estudo teve por objetivo traçar um perfil imunológico, através de marcação imunocitoquímica e quantificação de linfócitos T e B em bovinos da raça Curraleiro. Para tal, foram utilizados 116 animais entre machos e fêmeas, de diferentes faixas etárias, provenientes de duas propriedades de criação de gado Curraleiro do Estado de Goiás, sendo alocados em grupos conforme a faixa etária, sexo e origem. As amostras de sangue foram colhidas e processadas de acordo com o padrão da técnica de imunocitoquímica e posteriormente utilizados os marcadores linfóides espécie-específicos, anti-CD3 (MM1A – BoCD3) e anti-LB (LCTB16A – clone B-B14), para a quantificação de linfócitos T e linfócitos B, respectivamente. Todo procedimento foi realizado na Escola de Veterinária da UFG. Inicialmente os dados foram submetidos à estatística descritiva e posteriormente ao teste de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. Com o avançar da idade, diminuíram-se os níveis de leucócitos, linfócitos, linfócitos T e linfócitos B. Os valores absolutos de leucócitos, linfócitos e linfócitos T foram maiores nos machos em relação às fêmeas. Nenhum dos parâmetros avaliados sofreu influência em relação à diferença de qualidade de manejo nas duas propriedades.

Palavras-chave: imunocitoquímica, CD3, LB, leucócitos, pé-duro, perfil imunológico, leucograma.

ABSTRACT

The Curraleiro cattle are extremely docile and resistant to infectious diseases and parasites. They may be used in exploration of low-quality pastures, without great investments, when other breeds could show a low productivity or even survival difficulties. This genetic potential runs risk to extinction due to its replacement by more productive breeds. The Curraleiro cattle resistance to illness is popularly known and many works have been published about it, although its immunologic system physiology is completely unknown. Such features are plausible reasons for the preservation of this potentially genetic resource. So, the main aim of this study was to establish an immunological profile by marking and quantification of T and B lymphocytes in Curraleiro breed with immunocytochemistry. Thus, it was used 116 bovines, male and female, with different ages from two farms situated at Goiás State, Brazil. The animals were allotted in groups according to age, sex and origin. Blood samples were collected and processed in accordance with immunocytochemistry standard technique using lymphoid markers species-specific, anti-CD3 (MM1A – BoCD3) and anti-LB (LCTB16A – clone B-B14), for T and B lymphocytes counting, respectively. All procedures were accomplished at Veterinary School, Federal University of Goiás, Brazil. The data were submitted to descriptive statistics and then to Kruskal Wallis and Mann-Whitney tests. The results showed decreased levels of leukocytes, lymphocytes, T lymphocytes and B lymphocytes along the age advance. Absolute values of leukocytes, lymphocytes and T lymphocytes were higher in males than females. None of the evaluated parameters were affected by differences of the management carried out at two farms.

Key-words: immunocytochemistry, CD3, LB, leukocytes, immunological profile, leucogram.

1 INTRODUÇÃO

O bovino Curraleiro, como é popularmente conhecido nos estados de Goiás e Tocantins, ou Pé-duro, nos estados do Piauí e Maranhão, é uma das raças mais antigas do Brasil. Descendente dos bovinos trazidos pelos portugueses na época da colonização e pertencentes ao tronco *Bos taurus ibericus*, esses bovinos foram aos poucos se adaptando ao calor, à seca e às pastagens de baixa qualidade, o que resultou, com o passar dos séculos, em animais resistentes, rústicos e adaptados às condições adversas. No entanto, todo esse potencial genético encontra-se em sério risco de extinção, uma vez que esses animais vêm sendo substituídos por outras raças mais produtivas, principalmente os zebuínos (BARINI, 2007).

Esses animais, extremamente dóceis, resistentes às doenças e parasitas, poderiam ser utilizados sem grandes investimentos na exploração de pastagens naturais de baixa qualidade, onde outras raças teriam baixa produtividade ou até mesmo dificuldades de sobrevivência. Além disso, os cruzamentos industriais seriam uma alternativa de utilização do gado Curraleiro, com o intuito de obter animais mais resistentes e adaptados (BARINI, 2007).

As características destes animais são notáveis justificativas para conservar este recurso genético potencialmente importante. Entretanto, os estudos sobre essa raça ainda são escassos, o que requer o desenvolvimento de pesquisas que visem o conhecimento específico da mesma e, conseqüentemente, objetivem a sua preservação (JULIANO, 2006). Para tais, inúmeros são os métodos laboratoriais que podem ser utilizados para a caracterização genotípica desta espécie, entre elas destacam-se a imunistoquímica e a imunocitoquímica.

OLIVEIRA (1998) afirmou que estas técnicas vêm sendo utilizadas com grande impacto em patologia humana e veterinária, devido a sua elevada sensibilidade e especificidade. Ao combinar técnicas histológicas e imunológicas, a imunistoquímica e a imunocitoquímica, possibilitam a detecção de antígenos tissulares *in situ*, por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GIMENO, 1995).

Os grandes avanços científicos e tecnológicos igualmente determinaram as mudanças na prática da hematologia moderna, influenciando especialmente no diagnóstico laboratorial e nos procedimentos terapêuticos. O progresso obtido pela imunologia tem contribuído com o desenvolvimento do diagnóstico laboratorial de diversas doenças hematológicas e determinação de especificidades da fisiologia leucocitária. Os exemplos mais recentes se baseiam na imunohematologia moderna, direcionada à diferenciação das células, em especial dos leucócitos, por meio da identificação de seus antígenos, conhecidos por "*cluster of differentiation*" ou CD, e caracterização funcional das citocinas. Por esse motivo, as aplicações de métodos diagnósticos alicerçados na biologia molecular se tornam, cada vez mais, instrumentos laboratoriais de grande importância e sensibilidade (NAOUM, 2001).

A presente dissertação tem como objetivo principal a realização de imunofenotipagem de linfócitos T e B circulantes em bovinos da raça Curraleiro, mantidos sob sistema de criação extensivo, estabelecendo-se um perfil imunológico da raça.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Retrospectiva do Curraleiro no Brasil

Na época da colonização, em meados do século XVI, iniciou-se a criação de gado no Brasil, revelando-se de grande importância para a colônia recém-descoberta. Os bovinos foram trazidos por colonizadores portugueses e espanhóis. A história da introdução do gado bovino no Brasil atribui-se a Tomé de Souza, o primeiro Governador Geral do Brasil, o qual introduziu os animais diretamente nas capitânicas hereditárias onde atualmente estão os Estados de Pernambuco, Bahia e São Paulo (VELLOSO, 1996; JULIANO, 2006).

Como na América do Sul não existiam animais da espécie bovina, foi necessário trazer da Península Ibérica e, eventualmente das ilhas Canárias e de Cabo Verde, o gado indispensável à produção de leite e carne durante a longa fase da colonização (PRIMO, 1992; BRITTO, 1998; MARIANTE & EGITO, 2002). Os animais eram transportados junto aos escravos, desembarcavam e eram trocados por açúcar e outras mercadorias (PRIMO, 1992; BRITTO, 1998). As raças nativas importadas deram início ao povoamento dos campos naturais do Brasil e adaptaram-se ao novo ambiente, formando grandes rebanhos e originando diversas variedades, algumas das quais, hoje, são geneticamente melhoradas (PRIMO, 1992). De acordo com ATHANASSOF (1958) e PAULA NETO (2004), estes bovinos pertenciam a três troncos: *Bos taurus ibericus*, *Bos taurus aquitanicus* e *Bos taurus batavicus*.

No Brasil, a primeira introdução de gado bovino data de 1534, em São Paulo, na cidade de São Vicente, por ordem do donatário desta capitania hereditária, Martin Afonso de Sousa, sendo os animais enviados de Portugal por sua mulher, Dona Ana Pimentel, para serem criados na Fazenda “Madre de Deus”, em Inguaguassú (PRIMO, 1992; VELLOSO, 1996; JULIANO, 2006). O gado de São Vicente espalhou-se pelo rio das Velhas, chegando ao São Francisco, em Minas Gerais. É certo que de São Vicente foram levadas reses para Goiás e, em 1759, às margens dos rios das Almas e Canabrava (Sertões de Amaro Leite, atualmente Mara Rosa), onde dois padres Jesuítas teriam seis

fazendas, contendo mais de três mil cabeças bovinas (PRIMO, 1992; JULIANO, 2006).

O gado conhecido no Piauí e Maranhão como Pé-duro e, como Curraleiro em Goiás e Tocantins, provém da união das raças portuguesas Alentajana e Galega, com animais de origem espanhola pertencentes ao tronco *Bos taurus ibericus*, introduzidos por meio das colônias do Prata (VIANA, 1927; PAULA NETO, 2004). Segundo CARVALHO & GIRÃO (1999), PAULA NETO (2004) e JULIANO (2006), esses animais seriam descendentes da raça Mirandesa, mais particularmente da variedade Beiroa, presente em Portugal e na província espanhola de Leon. Porém, parece pouco provável que apenas bovinos mirandeses tenham originado o gado Curraleiro, mas sim um grupo de animais originários de diferentes grupos genéticos, que, na época, não eram reconhecidos como raça. Esses bovinos adequaram-se gradativamente a pastagens de baixa qualidade, a condições de baixa umidade, ao calor e outros fatores adversos. O resultado dessa seleção natural foi a sobrevivência de animais altamente resistentes e adaptados às condições desfavoráveis dos trópicos.

De acordo com dados históricos, as raças Curraleiro, Crioulo Lageano e Pantaneiro, provavelmente possuem ancestral comum, o *Bos taurus ibericus*, enquanto as raças Caracu e Mocho Nacional têm como provável ancestral o *Bos taurus aquitanicus* (PRIMO, 1992).

Algumas das principais características de porte e conformação do gado Curraleiro são: peso animal adulto de 380 kg para os touros e 300 kg para as fêmeas, assim como altura mínima de 1,38 m e 1,24 m, respectivamente. As pelagens mais comuns são a vermelha clara e a baia, com extremidades, vassoura, focinhos e espelho nasal pretos. Algumas reses também apresentam tonalidades escuras no chanfro e em torno dos olhos (Figura 1). As orelhas são pequenas, a barbela e o umbigo são reduzidos, os chifres geralmente são curtos, em forma de coroa ou longos em meia lira, e os membros são delgados e bem proporcionados (BRITTO, 1998; JULIANO, 2006).

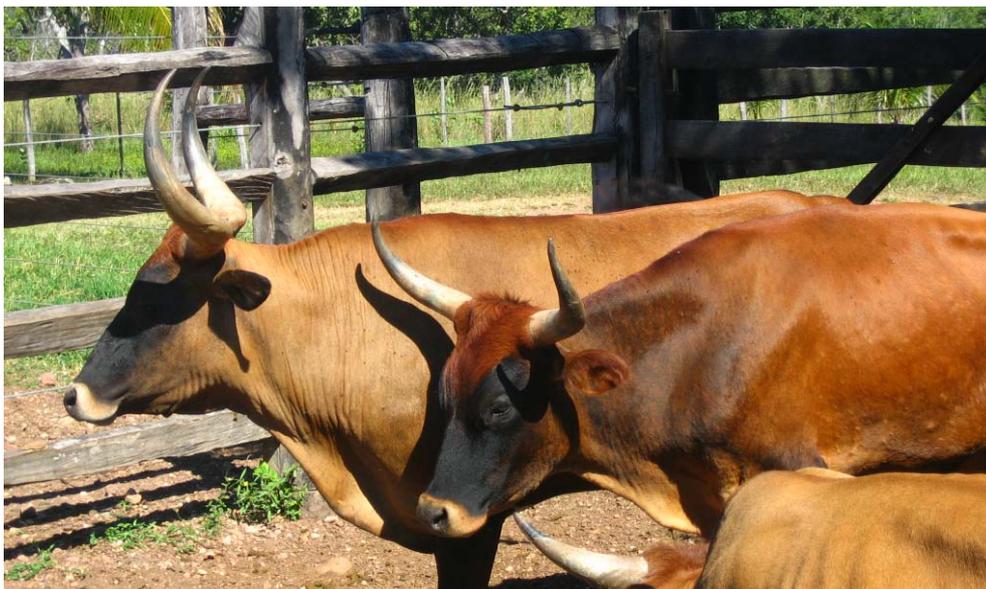


FIGURA 1 – Exemplos de bovinos da raça Curraleiro, do município de Cavalcante-GO, com características zootécnicas próprias da raça. Fonte: BARINI (2007).

De acordo com CARVALHO & AMORIM (1989), a raça Curraleiro formou-se em regime de criação super extensiva com mínimos cuidados sanitários e de alimentação, resultando em animais extremamente rústicos, que constituem recurso genético para a pecuária brasileira. Dados disponíveis demonstram extraordinária habilidade combinatória entre raças naturalizadas e destinadas à exploração comercial, tornando necessária a avaliação de potencial e uso racional nos países da América Latina (CAMARGO, 1984; JULIANO, 2006).

Na América Latina, o gado naturalizado foi a base da pecuária por quase cinco séculos, porém, nos dias de hoje encontra-se a ponto de ser totalmente absorvido por outras raças. Algumas populações vêm sendo cruzadas com linhagens exóticas sem nenhum plano sistemático de melhoramento, na expectativa de que as raças introduzidas diluam problemas de produção que estão associados a outros entraves da pecuária, como sanidade e nutrição (CAMARGO, 1984; JULIANO, 2006).

A resistência a doenças é um atributo particularmente importante nos sistemas de produção pecuária e a sanidade pode ser fator limitante na sustentabilidade desses sistemas. A possibilidade de aumentar a resistência genética a doenças em um rebanho é bastante viável aplicando-se técnicas simples, como a inclusão de raças nativas ou naturalizadas nos programas de

melhoramento genético, ou ainda, utilizando marcadores moleculares na seleção de reprodutores (GIBSON, 2002; GIBSON & BISHOP, 2005).

A extinção de raças naturalizadas brasileiras representaria perda irreparável para a ciência, pois, com elas, desapareceriam também inúmeras informações contidas na estrutura genética, esta última desenvolvida ao longo de séculos de seleção natural, sendo que, certamente, tal seleção secular conferiu ao Curraleiro características de boa adaptação ao meio e maior resistência a doenças e parasitas (MARIANTE & CAVALCANTE, 2000). A resistência do Curraleiro às enfermidades que comumente afetam os rebanhos bovinos é popularmente conhecida e divulgada, porém desconhece-se por completo a fisiologia do sistema imunológico desses animais (JULIANO, 2006).

Diante disso, grupos de pesquisadores têm se empenhado em estabelecer programas de conservação destinados à proteção desse patrimônio genético, seja na forma de núcleos de criação (*in situ*) ou por meio da armazenagem de material genético em laboratório (*ex situ*). Os programas de conservação *in situ* de populações animais, domésticas ou silvestres, implicam inicialmente em aumentar o número de indivíduos, garantindo a variabilidade genética da espécie envolvida. Para tanto, utilizam-se técnicas de manejo destinadas a maior circulação de animais entre criatórios, estimula-se a abertura de novos núcleos de criação e aplicam-se biotecnologias designadas a maximizar a eficiência reprodutiva da população (JULIANO, 2006).

Aproximadamente 50% das populações ou tipos raciais desenvolvidos no Brasil já foram extintos ou vêm sofrendo processo progressivo de extinção. Algumas raças eximiram-se da situação de risco que se encontravam como é o caso da raça Caracu, que alcançou tal êxito graças a trabalhos desenvolvidos em parceria com órgãos governamentais, associações de criadores e empresas particulares (PRIMO, 1992). Dentre as raças desenvolvidas no Brasil, a do gado Curraleiro é uma das que requerem atenção particular, já que não há informações precisas sobre o número de animais, localização e características de seus criatórios, bem como sobre particularidades fisiológicas e sanitárias da raça (CARVALHO, 1985).

Nas últimas décadas, a raça Curraleiro foi gradativamente substituída por outras consideradas mais produtivas, particularmente pelas zebuínas, por isso, os animais estão condenados ao desaparecimento. Vale

ressaltar que fatalmente desaparecerão características desta raça, como rusticidade, adaptação e resistência a doenças, que não serão transferidas a outras raças comercialmente mais valorizadas (JULIANO, 2006).

O gado Curraleiro pode ser encontrado nos estados do Maranhão, Piauí, Goiás e Tocantins. Seus criadores ressaltam a rusticidade, o baixo custo de produção e a baixa exigência nutricional como qualidades indiscutíveis desses animais (JULIANO, 2006). Atualmente existem poucas informações disponíveis sobre o rebanho nacional de Curraleiro, sendo que, em 1992, estimava-se que este fosse formado por menos de 300 animais. Como a tendência deste número é diminuir, vários animais foram alocados em núcleos de preservação oficial e de iniciativa privada (MARIANTE & DE BEM, 1992).

Em 1997, apoiada pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), foi registrada no Ministério da Agricultura e Abastecimento, a Associação Brasileira de Criadores de Curraleiro (ABCC), sediada em Mara Rosa, GO, que tem como objetivo a preservação da raça. Além disso, a EMBRAPA vem mantendo em São João do Piauí, uma fazenda de conservação do gado Pé-duro, também com o propósito de evitar o desaparecimento da raça (PAULA NETO, 2004). A ABCC apresenta cadastro, com atualização datada de março de 2005, de 22 criatórios, com número estimado de 2008 animais (BOAVENTURA et al., 2005).

Em 2000, em parceria com as fazendas Trijunção, a Universidade Federal de Goiás montou uma Estação Experimental de Estudo do Gado Curraleiro (EEEGC), localizada nestas propriedades, com o intuito de adquirir maiores conhecimentos acerca da raça, por meio da elaboração e execução de projetos de pesquisa. As fazendas Trijunção compreendem um conjunto de propriedades rurais situadas na divisa dos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, que originou o nome Trijunção e onde há criação de Curraleiro e Caracu, além de ovinos, caprinos e animais silvestres (PAULA NETO, 2004). Destaca-se que em 2003, iniciou-se uma nova etapa de trabalho na intenção de registrar a raça Curraleiro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (JULIANO, 2006).

Para a preservação da raça é importante o conhecimento prévio das características fisiológicas e as principais doenças que acometem estes animais, sendo indispensável que se determinem os diferentes parâmetros

hematológicos nas diferentes fases da vida do animal. O estabelecimento do perfil hematológico assume papel importante tanto na avaliação do estado geral como meio auxiliar na caracterização diagnóstica de várias enfermidades tanto no indivíduo como no rebanho (MORRIS & LARGE, 1993).

2.2 Sistema imune: características gerais

Desde os primeiros estudos e descobertas, a imunologia tem passado por rápida transformação, paralela aos avanços da tecnologia aplicada à saúde humana e animal. Mesmo assim, ainda há muito a ser investigado sobre a interação do sistema imunológico com processos fisiológicos, patológicos e epidemiológicos dos animais domésticos. Os componentes do sistema imunológico e suas funções na manutenção do estado de saúde dos animais podem ser investigados por meio de diferentes métodos diagnósticos, como a imunistoquímica e a imunocitoquímica (JULIANO, 2006).

A resposta imune é elaborada a partir de tecidos, células e mediadores químicos especializados, que formam o sistema imune. A eficiência funcional desse sistema depende da capacidade do mesmo em reconhecer antígenos endógenos e exógenos de ação deletéria ao organismo como um todo ou a determinados órgãos, tecidos ou células. Tal reconhecimento ativa o sistema imune para neutralização ou diluição de antígenos, sendo que os linfócitos desempenham papel central neste âmbito. A resposta imune é altamente antígeno-específica, porém células fagocitárias do sistema de defesa tecidual podem atuar de forma inespecífica tanto para a apresentação inicial do antígeno como para efetuar a lise final do patógeno (STEVENS & LOWE, 2001).

Qualquer resposta imune envolve inicialmente o reconhecimento do patógeno e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação dirigida a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo. Assim, definem-se dois tipos de resposta imune: inata e adquirida. A resposta inata é inespecífica, realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos, os quais identificam a partícula antigênica, fagocitam-na e desencadeiam a liberação de citocinas que

contribuem para a instalação do processo inflamatório e para a intensificação da resposta imune. Já a resposta adquirida apresenta especificidade na identificação de antígenos, aumenta a intensidade da resposta imune com a exposição repetida a antígenos e tem característica de memória imunológica, sendo que os linfócitos constituem as principais células desta resposta imune específica (ROITT et al., 2003; BALESTIERI, 2006; JANEWAY et al., 2007).

Todas as células do sistema imune possuem proteínas citoplasmáticas ou de membrana celular específicas, que são denominadas de acordo com um sistema internacional de identificação que as relaciona com proteínas que se expressam em diferentes fases da maturação celular (epítomos). Essas proteínas são chamadas de grupos de diferenciação celular ou CD (*cluster of differentiation*) e podem ser reconhecidas por anticorpos monoclonais sintetizados em laboratório. Anticorpos contra diferentes moléculas CD podem ser utilizados para identificar células linfóides, por meio da detecção de epítomos específicos, com o emprego de técnicas imunológicas de marcação como a imunoistoquímica e a imunocitoquímica, procedimento este denominado imunofenotipagem (NAOUM, 2001; STEVENS & LOWE, 2001; NAKAGE et al., 2005; BALESTIERI, 2006). Segundo NAKAGE et al. (2005), os anticorpos monoclonais são os reagentes de escolha para a realização da imunofenotipagem, devido à sua alta especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade.

Segundo NAOUM (2001), já foram reconhecidos em experimentação laboratorial aproximadamente 170 diferentes tipos de CD, e as relações entre as células identificadas e suas funções específicas também foram relacionadas. Entretanto, principalmente em relação aos linfócitos e macrófagos, é possível antever a importância da determinação dos CDs para a diferenciação e especificação de sub-populações das principais células do sistema imunológico.

2.2.1 Linfócitos

Os linfócitos são células do sistema imune que conferem especificidade à resposta imunológica por serem portadoras de receptores

específicos para os determinantes antigênicos presentes nos antígenos. São, portanto, as células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos estranhos e pela montagem das respostas imunes (TIZARD, 2002). Como existem diferentes formas de resposta imune, é razoável que existam várias populações e sub-populações de linfócitos, cada uma com características e funções diferentes (BALESTIERI, 2006).

Os linfócitos estão localizados em tecidos ou órgãos linfóides, que, de acordo com sua função, podem ser classificados em primários e secundários. Nos órgãos primários, como a medula óssea e o timo, os linfócitos passam por processos de maturação e diferenciação. Após estas fases, os linfócitos migram para os órgãos linfóides secundários, como linfonodos e baço, onde poderão exercer suas funções. Nos mamíferos, os precursores dos linfócitos que ficam na medula óssea se diferenciam em linfócitos B (LB), enquanto os que migram da medula óssea para o timo se diferenciam em linfócitos T (LT) (BALESTIERI, 2006; WIKSTRÖM, 2006; JANEWAY et al., 2007).

Nos mamíferos adultos, o desenvolvimento contínuo de novas células T no timo é reduzido devido à regressão inerente ao órgão nesta classe animal, sendo, portanto, a quantidade de LT mantida por meio de células T de longa duração e da divisão de LT maduros fora dos órgãos linfóides primários. Por outro lado, novas células B são continuamente produzidas pela medula óssea, mesmo nos indivíduos adultos (JANEWAY et al., 2007).

Os linfócitos são, em sua maioria, células pequenas de formato arredondado, variando de 7 a 15 μm de diâmetro, com uma borda fina de citoplasma, onde se encontram poucas organelas citoplasmáticas. No núcleo excêntrico, localiza-se a cromatina em estado condensado, que se cora intensa e uniformemente com a hematoxilina (TIZARD, 2002). Este aspecto é típico de células inativas, visto que não exibem atividade funcional até encontrarem um antígeno, assim como moléculas co-estimuladoras induzidas pela imunidade inata, as quais fornecem os sinais necessários para a ativação de sua proliferação e diferenciação de características funcionais especializadas (JANEWAY et al., 2007).

Os linfócitos possuem receptores para antígenos específicos que reconhecem e respondem à molécula apresentada e, eventualmente, são

responsáveis pela produção de anticorpos e pela destruição de células anômalas. Normalmente, estas respostas ocorrem no interior dos órgãos linfóides, o que proporciona ambiente adequado para uma eficiente interação entre linfócitos, células apresentadoras de antígenos e antígenos (TIZARD, 2002).

Dois tipos morfológicamente distintos de linfócitos são observados em esfregaços de sangue periférico: os linfócitos pequenos, agranulares e com alta relação núcleo/citoplasma (N:C), e os linfócitos grandes, com grânulos azurofílicos intracitoplasmáticos e baixa relação N:C (BALESTIERI, 2006). A primeira população celular é descrita como os linfócitos clássicos, ou seja, linfócitos T e B. Já a segunda população celular são os linfócitos grandes granulares, entre os quais se encontram as células exterminadoras naturais (*Natural killer cells* – NK) e os LT com receptores do tipo $\gamma\delta$ (gama/delta) (STEVENS & LOWE, 2001; TIZARD, 2002).

As células NK e os linfócitos T $\gamma\delta$ desempenham papel fundamentalmente citotóxico, ou seja, têm a capacidade de destruir células e antígenos que não tiveram ativação prévia por outros linfócitos T, fenômeno este denominado citotoxicidade mediada por células. Além de presentes em meio aos constituintes sanguíneos, também compõem as células do tecido esplênico, sendo que, quando presentes no sangue, assumem morfologia de linfócitos grandes granulares (STEVENS & LOWE, 2001; TIZARD, 2002; BALESTIERI, 2006; JANEWAY et al., 2007).

Apesar da aparência uniforme, linfócitos constituem uma mistura diversa de populações celulares, cada uma delas com propriedades e funções características. Embora estas populações não possam ser identificadas com base na sua estrutura, é possível identificá-las por suas proteínas de superfície celular características, os CDs, utilizando-se para tal os anticorpos monoclonais. Pela análise da imunofenotipagem celular, é possível mostrar que a população difere quanto a origem e função (TIZARD, 2002; NAKAGE et al., 2005; SUETAKE et al., 2006).

Segundo NAKAGE & SANTANA (2006) e SUETAKE et al. (2006), estudos citomorfológicos e citoquímicos são métodos clássicos para caracterizar e classificar células hematopoéticas, porém técnicas

imunoquímicas como a imunocitoquímica têm provido grande avanço na diferenciação e classificação de células sanguíneas.

a) Linfócitos T

Os linfócitos T foram assim designados por terem sua maturação completada no timo (FEITO et al., 2002; WIKSTRÖM, 2006). São encontrados em grande número nos órgãos linfóides especializados, mas também circulam no sangue e migram para os tecidos corporais. Constituem a população linfóide predominante, respondendo por até 80% dos linfócitos circulantes. Podem ser classificados em dois tipos: linfócitos T auxiliares (do inglês, *T Helper* - LTh) e T citotóxicos (LTc). (JAIN, 1993; TIZARD, 2002; BALESTIERI, 2006; FURTADO, 2006; SUETAKE et al., 2006), participando da resposta imune com funções reguladoras e com atividades efectoras ou citotóxicas, respectivamente (SUETAKE et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006).

As estruturas mais importantes na superfície dos linfócitos são os seus receptores antigênicos, os quais são adquiridos durante o processo de maturação, sendo estruturas complexas que contêm várias proteínas com diferentes funções. Algumas se ligam a antígenos e outras são responsáveis por transdução de sinais (TEIXEIRO et al., 2004; FURTADO, 2006; WIKSTRÖM, 2006). De acordo com JANEWAY et al. (2007), cada célula T possui cerca de 30.000 moléculas idênticas de receptores de antígenos em sua superfície, sendo cada receptor constituído de duas cadeias polipeptídicas diferentes.

O receptor antigênico das células T é dito como TCR (do inglês, *T cell receptor*) (BALESTIERI, 2006; JANEWAY et al., 2007), que pode ser classificado em duas categorias de acordo com a seqüência de aminoácidos na região constante: TCR-1 e TCR-2 (FURTADO, 2006). As células TCR-1 expressam as cadeias γ e δ (gama e delta), constituindo o receptor $\gamma\delta$ da célula T (TCR $\gamma\delta$), enquanto as células do TCR-2 expressam cadeias α e β (alfa e beta), formando o receptor $\alpha\beta$ da célula T (TCR $\alpha\beta$). Sabe-se ainda que ambos, LTc e LTh, possuem seqüência TCR-2 (FEITO et al., 2002; TIZARD, 2002; KUHNS et al., 2006; LE DEIST et al., 2007).

O TCR-1 é assim denominado, pois os LT que expressam esse receptor surgem antes dos linfócitos que expressam TCR-2, durante o processo de maturação no timo (BALESTIERI, 2006). Nos humanos, camundongos e, provavelmente, na maioria dos não-ruminantes, aproximadamente 90% das células T possuem receptores $\alpha\beta$, sendo o restante de receptores $\gamma\delta$ (VESOSKY et al., 2003; KUHNS et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006). O contrário ocorre em ruminantes, nos quais acima de 60% da população de células T apresentam TCR $\gamma\delta$ (TIZARD, 2002; PESSA-MORIKAWA et al., 2004).

Diferente das imunoglobulinas, os TCRs não reconhecem antígenos solúveis, devendo assim interagir com antígenos ligados a moléculas de apresentação antigênica, os complexos de histocompatibilidade maior (MHC) (KUHNS et al., 2006), os quais estão presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC), como os macrófagos (DRAKE et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006). As APCs circulam pelo organismo ingerindo e digerindo os antígenos, fragmentando-os em peptídeos, fenômeno este denominado fagocitose (STEVENS & LOWE, 2001). Parte desses peptídeos se liga a moléculas do MHC e são apresentados na superfície celular sob a forma de complexo MHC/peptídeo. Em determinadas situações, todos os leucócitos podem exercer a função de apresentadores de antígenos, porém macrófagos, células dendríticas e linfócitos B compreendem os componentes mais importantes para esse desígnio (DRAKE et al., 2006; FURTADO, 2006; JANEWAY et al., 2007).

As proteínas das APCs são de dois tipos: MHC classe I e MHC classe II, que estimulam respectivamente os LTc e LTh (FURTADO, 2006; SUETAKE et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006). Os TCRs têm a função de reconhecer diferentes complexos MHC/peptídeo (ARNETT et al., 2004) e, uma vez ativados por este reconhecimento, os LTc se dividem e secretam citocinas, enquanto os LTh mobilizam outros componentes do sistema imunológico, participando ativamente na imunorregulação (FURTADO, 2006; JANEWAY et al., 2007).

A ligação do antígeno ao TCR deve enviar um sinal ao LT para desencadear uma resposta imunológica (CALL & WUCHERPFENNIG, 2005).

As cadeias de ligação do antígeno ao TCR estão sempre associadas de forma não-covalente com um grupo de glicoproteínas coletivamente denominadas de complexo CD3, o qual transfere o sinal da molécula TCR ao LT (FEITO et al., 2002; CALL & WUCHERPFENNIG, 2004; KUHNS et al., 2006; LE DEIST et al., 2007). Desta forma, o TCR e o CD3 formam complexos que se aderem na superfície das células T, por esse motivo o CD3 é uma proteína obrigatoriamente presente na membrana das células T (ARNETT et al., 2004; CALL & WUCHERPFENNIG, 2005; SUETAKE et al., 2006; LE DEIST et al., 2007).

Outra proteína importante encontrada nas células T, designada CD8, é imunomarcada apenas nas células T que podem atacar e lisar células alvo, os linfócitos T citotóxicos (LTc) (STEVENS & LOWE, 2001; FURTADO, 2006; WIKSTRÖM, 2006). Esse tipo celular reconhece antígenos não processados quando apresentados por células em associação com moléculas do MHC de classe I. Portanto, estes linfócitos são identificados como CD3+/CD8+ (SUETAKE et al., 2006; LE DEIST et al., 2007).

O CD4 compreende outra proteína presente somente em células T auxiliares (LTh), que reconhecem antígenos exógenos processados. Portanto, estes linfócitos são identificados como CD3+/CD4+ (STEVENS & LOWE, 2001; SUETAKE et al., 2006; LE DEIST et al., 2007). O CD4 é um receptor de células T para as moléculas do MHC de classe II, presentes na superfície das APCs. Os LTh ativam a resposta imune secretando citocinas, auxiliando assim outras células a realizarem suas funções efetoras (FURTADO, 2006; SUETAKE et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006).

Há ainda um terceiro tipo celular, os linfócitos T supressores, que podem expressar tanto moléculas CD4 como CD8. Agem inibindo a resposta gerada pelas células LTh, modulando a resposta imune (STEVENS & LOWE, 2001; TIZARD, 2002; WIKSTRÖM, 2006).

Em contrapartida, alguns linfócitos T podem não expressar nenhum dos dois marcadores, caracterizando linfócitos T duplamente negativos, ou seja, CD4-/CD8- (LE DEIST et al., 2007). As células CD4-/CD8- compõem grande parte da população linfóide sanguínea nos ruminantes jovens, podendo chegar a 80% nos bezerros recém-nascidos e a 60% nos bovinos adultos. A

maioria destas células duplamente negativas possui o TCR $\gamma\delta$, sendo denominados linfócitos T $\gamma\delta$, que também expressam CD3 (TIZARD, 2002; PESSA-MORIKAWA et al., 2004). Enquanto as funções das células T $\alpha\beta$ na resposta imune estão bem caracterizadas, as das células T $\gamma\delta$ são bem menos definidas (FERENS et al., 1998; VESOSKY et al., 2003).

Já as células NK não expressam CD3, contudo, podem também ser reconhecidas por métodos imunquímicos, pois expressam CD16, CD56 e outros (STEVENS & LOWE, 2001).

b) Linfócitos B

Os linfócitos B concentram-se principalmente em órgãos linfóides especializados, embora um pequeno número mantenha-se na circulação sanguínea, contribuindo com aproximadamente 10% a 20% dos linfócitos circulantes (STEVENS & LOWE, 2001; FURTADO, 2006).

Semelhante às células T, todo LB possui receptores antigênicos em sua superfície, porém em proporção bem maior, ou seja, cada LB possui cerca de 200.000 a 500.000 moléculas idênticas de receptores de antígenos (TIZARD, 2002). No caso dos LB, os receptores de antígeno são chamados BCR (do inglês, *B cell receptor*). Estes receptores são moléculas de imunoglobulinas (Ig) associadas de forma não-covalente a moléculas heterodiméricas da superfamília das Igs, a Ig α e a Ig β , que em conjunto formam o BCR (BALESTIERI, 2006; SUETAKE et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006). As Ig α e a Ig β são também chamadas, respectivamente, de CD79a e CD79b, as quais atuam no BCR como transdutores de sinal e são encontradas em todas as linhagens e fases de maturação dos linfócitos B (STEVENS & LOWE, 2001; TIZARD, 2002).

O BCR, da mesma forma que o TCR, pode ser dividido em dois componentes diferentes, sendo que um se conjuga com o antígeno e o outro envia um sinal apropriado para a célula B (WIKSTRÖM, 2006). Diferente dos receptores das células T, os BCRs são capazes de reconhecer partes livres solúveis dos antígenos, sem necessidade de participação das moléculas do MHC (DRAKE et al., 2006).

As moléculas de imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de aproximadamente 160kDa, também chamadas de anticorpos (TIZARD, 2002). São proteínas da fração de gamaglobulinas, sintetizadas por linfócitos B, sendo seus BCRs solúveis, que possuem capacidade de reconhecer, precipitar ou neutralizar microorganismos invasores ou proteínas estranhas (STEVENS & LOWE, 2001). De acordo com TIZARD (2002), existem cinco classes diferentes de Ig e BCR, os quais diferem quanto ao uso das cadeias pesadas, sendo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Quando estimuladas por um antígeno, as células B se dividem e se diferenciam em plasmócitos, secretando altas concentrações de anticorpos. A ligação dos anticorpos ao patógeno faz com que o mesmo seja neutralizado e, em seguida, lisado por enzimas do sistema complemento ou por fagócitos (FURTADO, 2006; JANEWAY et al., 2007).

Os linfócitos B, os plasmócitos e os anticorpos são a base da resposta imune humoral. Algumas células B se transformam em células de memória, que permanecem na circulação e garantem resposta rápida e eficaz contra futuras exposições àquele antígeno (STEVENS & LOWE, 2001; TIZARD, 2002; JANEWAY et al., 2007).

As células B também desempenham importante função de APCs. Possuem receptores específicos que podem se ligar à moléculas antigênicas inteiras, os MHC de classe II. Depois disso, as células B endocitam e processam antígenos antes de apresentá-los, em associação com moléculas de MHC, para as células T (TIZARD, 2002; SUETAKE et al., 2006). A importância das células B como células processadoras de antígenos pode ser confirmada pela resposta prejudicada das células T em animais que possuem depleção de células B (TIZARD, 2002).

Da mesma forma que ocorre nos LT, outras proteínas também são encontradas na superfície das células B, como CD19, CD20 e CD22, que são os principais marcadores utilizados na identificação dos LB por imunofenotipagem. O CD10 é encontrado nas células pré-B e é perdido durante a fase de maturação celular. O CD21 e CD35 são receptores para o sistema complemento, sendo então expressos quando os LB são ativados. O CD40 é expresso nos LB e está envolvido nos sinais de ativação dos LTh. Além dos descritos acima, os LB possuem outros marcadores de superfície, os

quais podem, da mesma maneira, ser identificados por anticorpos monoclonais (STEVENS & LOWE, 2001; WIKSTRÖM, 2006).

2.3 Fatores que podem influenciar os valores leucocitários em bovinos

Nos bovinos, condições ambientais e regionais, tipo de alimentação e criação, qualidade do alimento, higiene, condições do solo, variações estacionais, idade, sexo, raça e condições patológicas subclínicas e clínicas influenciam significativamente nos resultados laboratoriais desta espécie (HAIDER et al., 1989; BIRGEL JUNIOR, 1991; BIRGEL, 1997; FAGLIARI, 1998). Segundo JAIN (1993), alguns valores sanguíneos são significativamente influenciados pela idade e, em menor grau, pelo sexo e raça. Outros fatores como distúrbio emocional, excitação, atividade muscular, temperatura ambiente e altitude também influenciam em alguns parâmetros sanguíneos. O número de linfócitos, particularmente em animais jovens, é semelhantemente elevado por distúrbios emocionais e exercícios, em função do aumento do fluxo nos ductos torácicos.

Para BIRGEL JÚNIOR (1991), fatores ambientais exercem significativa influência sobre o quadro hematológico dos animais, que pode apresentar evidentes variações dos constituintes sanguíneos. Assim, valores obtidos para animais criados em determinada região, não podem ser considerados sem adequada avaliação, como padrão de referência para os de outra região.

A interpretação de resultados laboratoriais em Medicina Veterinária é fundamentada em valores de referência obtidos de uma população representativa, mas JENSEN et al. (1992) constataram que uma enfermidade pode afetar algum parâmetro laboratorial no indivíduo e o resultado pode encontrar-se dentro do intervalo correspondente para a população, mas fora do seu próprio intervalo de referência.

Como já é clara a ocorrência de variações individuais, ressalta-se a importância da obtenção de valores regionais de referência (BIRGEL JÚNIOR, 2001). BIRGEL JUNIOR (1991) relatou que valores padrões encontrados na literatura internacional e considerados como de referência nos países do

Hemisfério Norte não devem ser adotados no Brasil, pois podem resultar em erros grosseiros de interpretação.

Para AYRES (1994) e COSTA (1994), no caso particular do bovino, é importante ressaltar que as várias raças criadas no Brasil pertencem a duas espécies distintas: os taurinos (*Bos taurus*) e os zebuínos (*Bos indicus*), o que implica em maiores variações e, conseqüentemente, na necessidade de estabelecer valores de referência específicos para cada uma das raças que compõe o nosso rebanho.

FAGLIARI et al. (1998), ao analisarem amostras de sangue de bovinos lactentes, desmamados e adultos, das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), assim como de bubalinos na raça Murrah, concluíram que a contagem de leucócitos dos bovinos desmamados da raça Holandesa foi superior à da raça Nelore e semelhante à dos bubalinos, demonstrando assim a influência racial sobre a contagem de leucócitos.

De acordo com GONÇALVES et al. (2001), os hemogramas dos bovinos da raça Guzerá mostraram-se dentro da faixa de normalidade citada na literatura internacional para outras raças bovinas, sendo também próximos aos valores relatados para outras raças zebuínas do Estado de São Paulo.

BIONDO (1998), estudando a influência de fatores etários e sexuais no hemograma de bovinos da raça Nelore no primeiro mês de vida, concluiu que não houve diferença quanto aos fatores sexuais no eritrograma e leucograma dos animais. Já PAULA NETO (2004) relatou que em seu delineamento com bovinos da raça Curraleiro, o sexo influenciou no valor médio de leucócitos, sendo maior nos machos.

O número de leucócitos circulantes varia consideravelmente entre os bovinos. Geralmente, há uma tendência da contagem dos leucócitos ser maior ao nascimento e na fase de crescimento, apresentando redução gradual com o avanço da idade (JAIN, 1993).

Segundo WYATT et al. (1994), KULBERG et al., (2004) e KAMPEN et al. (2006), bezerras e novilhas apresentam maiores valores absolutos de linfócitos no sangue periférico que os animais adultos, sendo que os bezerras possuem uma alta proporção de linfócitos T expressando o TCR $\gamma\delta$, comparado aos animais mais velhos.

BIRGEL JUNIOR (1991), COSTA (1994), FAGLIARI et al. (1998), GONÇALVES et al. (2001) e PAULA NETO (2004), estudaram a influência da idade na variação leucocitária e observaram diminuição na contagem dos linfócitos com o avançar da idade. Do mesmo modo, CANFIELD (1994), COLE et al. (1997), MONKE et al. (1998), COSTA et al. (2000), KNOWLES et al. (2000) e BIRGEL JÚNIOR (2001) observaram uma baixa contagem de linfócitos ao nascimento, com um considerável aumento após os primeiros dias de vida. Segundo GARCIA-NAVARRO et al. (1994), animais em crescimento apresentam índices linfocitários mais elevados que os adultos devido à atividade imunogênica mais intensa nos jovens.

Segundo JAIN (1993), pequenas diferenças entre os sexos podem ocorrer, porém diferenças significativas ocorrem mais em relação à idade, tanto na contagem total, quanto na contagem diferencial de leucócitos. O mesmo autor afirmou que mudanças típicas da resposta ao estresse podem ser observadas em ambas as contagens de leucócitos nas vacas recém-paridas. O número de linfócitos é variável, dependendo do grau de estresse envolvido, e o número dos outros tipos de leucócitos varia, dependendo também deste fator e das condições das membranas fetais.

Mudanças na contagem total e diferencial de leucócitos também são evidenciadas durante a gestação e no período pós-parto. Contagens de leucócitos totais e número de linfócitos são maiores entre 30 e 60 dias de gestação do que aos 90 dias. O aumento de corticosteróides plasmáticos, no período de uma a 24 horas pós-parto é responsável pelo aumento na contagem de leucócitos totais e número de neutrófilos e na diminuição do número de linfócitos e eosinófilos (JAIN, 1993).

Parece claro que a detecção e a quantificação dos diferentes componentes do sistema imunológico, como os linfócitos T e B, assim como a análise morfológica dessas células, compreendem ferramentas de grande valia para a avaliação desse sistema orgânico primordial, seja em situações de normalidade ou quando este é submetido a condições de estímulo ou supressão.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar imunofenotipagem de linfócitos T e B circulantes em bovinos da raça Curraleiro, mantidos sob sistema de criação extensivo, estabelecendo-se um perfil imunológico da raça.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar imunomarcção de linfócitos T e B em sangue periférico de bovinos da raça Curraleiro, utilizando-se a técnica de imunocitoquímica e marcadores linfóides espécie-específicos (pan T e pan B).
- Quantificar linfócitos T e B marcados pela imunocitoquímica, em bovinos agrupados quanto ao sexo, idade e propriedade, utilizando-se a contagem individual de células marcadas e visualizadas à microscopia óptica.
- Comparar os resultados da quantificação de linfócitos T e B dentre os grupos de bovinos da raça Curraleiro submetidos a condições semelhantes de criação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de colheita das amostras

As amostras de sangue de bovinos da raça Curraleiro foram colhidas no período de agosto a dezembro de 2007 em duas propriedades, sendo uma localizada no município de Planaltina–DF (propriedade A) e a outra no município de Caiçara–GO (propriedade B). As propriedades foram selecionadas junto à Associação Brasileira dos Criadores do Gado Curraleiro (ABCC), situada na cidade de Mara Rosa, GO. O principal critério utilizado foi a pureza zootécnica dos animais, comprovada pela associação, estando entre as principais propriedades de criação de bovinos da raça Curraleiro no Estado de Goiás.

4.2 População avaliada

Avaliou-se uma população bovina constituída por 116 animais da raça Curraleiro (*Bos taurus*), hígidos (cl clinicamente sadios), previamente selecionados e mantidos em regime extensivo. Os animais foram agrupados conforme o sexo, a faixa etária e a propriedade de origem (Quadro 1).

QUADRO 1 – Caracterização dos grupos experimentais de acordo com o sexo, a idade e a origem dos animais.

Grupos	Propriedade	Animais	Sexo	Idade
G1	A	10	Fêmeas	1-3 anos
G2	A	15	Fêmeas	>3 anos
G3	B	22	Fêmeas	0-1 ano
G4	B	16	Machos	0-1 ano
G5	B	9	Fêmeas	1-3 anos
G6	B	26	Fêmeas	>3 anos
G7	B	14	Fêmeas	≥10 anos
G8	B	4	Machos	>1 ano

Na propriedade A, o sistema de criação era de modo extensivo, sendo a área de pastagem dividida em piquetes com capim Braquiária, Colonião e Jaraguá, com suplementação durante todo o ano apenas com sal mineral. Os animais apresentavam-se em boas condições clínica e corpórea, com escores variando entre três e quatro, de acordo com o descrito por ALLEN (1992), que estabeleceu escores variando de zero a cinco.

Na propriedade B, o sistema de criação também era de modo extensivo, contudo a pastagem era composta apenas de capim Braquiária e os animais não recebiam suplementação, apresentando escores entre um e três. Nesta propriedade observou-se infestação moderada de carrapatos e mosca do chifre.

4.3 Avaliação clínica

Os bovinos foram submetidos ao exame clínico conforme o protocolo descrito por ROSENBERGER (1993), com o intuito de selecionar somente animais sadios.

4.4 Exames laboratoriais e imunocitoquímicos

4.4.1 Local

Os exames laboratoriais e técnica de imunocitoquímica foram realizados respectivamente nos Laboratórios de Patologia Clínica do Hospital Veterinário (HV) e Imunopatologia do Setor de Patologia Animal, ambos localizados na Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus II, Samambaia, Goiânia, Goiás.

4.4.2. Colheita das amostras de sangue

Previamente à colheita das amostras para a realização dos exames laboratoriais e imunocitoquímicos, os animais foram identificados com brincos

próprios para bovinos, sendo também obtidos dados referentes a sexo e idade.

Seqüencialmente foram obtidos 4 mL de sangue, por venopunção da jugular, por meio de dispositivo para coleta a vácuo em tubo descartável de 13x75 mm (Vacuette[®], Greiner Bio-One – São Paulo, Brasil), com anticoagulante EDTA (ácido etilediaminotetracético, sal dissódico) a 10% e utilizadas agulhas descartáveis 25x0,8 mm. Logo após a colheita, os tubos foram homogeneizados para que evitasse a coagulação das amostras, que permaneceram sob refrigeração até o momento da realização das análises laboratoriais que sempre eram concluídas antes de decorridas 24 horas do momento da colheita.

4.4.3. Hematologia

Ainda no local da colheita das amostras sanguíneas, distendiam-se dois esfregaços sangüíneos em lâminas histológicas com extremidade fosca, com uma gota de sangue *in natura*, destinados à contagem diferencial de leucócitos. Após secagem, os esfregaços eram imediatamente fixados com metanol por cinco minutos e acondicionadas em caixas de plástico apropriadas, para posteriormente serem coradas e avaliadas.

No Laboratório de Patologia Clínica do HV/EV/UFG, os hemogramas foram processados em aparelho automatizado (ABX Micros ABC Vet – Horiba ABX Diagnostics – Montpellier, França), utilizando-se cartão de leitura próprio para a espécie. Neles foram determinados os valores de eritrograma e leucograma. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados pelo método de Rosenfeld, segundo a técnica padronizada por BIRGEL (1982). Em cada esfregaço sangüíneo diferenciavam-se 100 leucócitos, procurando classificá-los de acordo com suas características morfológicas e tintoriais, conforme JAIN (1993).

O fibrinogênio plasmático foi dosado com o objetivo de monitoramento da higidez dos animais, sendo utilizada a técnica do microhematócrito, seguindo orientações de COLES (1986).

4.4.4. Imunocitoquímica

Para a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD3 (MM1A – BoCD3, anti-mouse, VMRD, Inc – Pullman, USA) e anti-LB (LCTB16A – B-B14, anti-mouse, VMRD, Inc – Pullman, USA), espécie-específicos para bovinos, empregou-se o método streptoavidina-biotina-peroxidase descrito por HSU et al. (1981), sendo utilizadas duas lâminas por animal. Foi necessária a padronização prévia dos anticorpos, visto que os mesmos são indicados preferencialmente para a técnica de citometria de fluxo. Neste sentido, foram realizados cinco testes com diferentes tipos de esfregaços sangüíneos no intuito de se obter um tipo ideal de esfregaço, bem como a recuperação antigênica e concentrações adequadas dos anticorpos a serem empregados na técnica de imunocitoquímica.

O material, objeto dos testes, era disposto sobre as lâminas e após a secagem as mesmas submersas em álcool 95%, onde permaneceram, por no máximo quatro meses, até o momento do processamento imunocitoquímico.

Todos os testes da padronização da técnica de imunocitoquímica foram realizados como testes pilotos, sendo coletadas as amostras dos bovinos Curraleiros somente após a definição do teste a ser utilizado.

O primeiro teste (T1) foi com o esfregaço sangüíneo padrão franja, utilizado rotineiramente na técnica de contagem de células sangüíneas. Foi feito o bloqueio da enzima peroxidase endógena em água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes por 20 minutos e, em seguida, realizou-se a recuperação antigênica testando-se: o tampão citrato em pH 6,0 (anexo 1), por cinco minutos, na panela de pressão e a solução de EDTA em pH 8,0 (anexo 2), por 30 minutos, no banho-maria à 95°C. Após este processo, os esfregaços foram submersos em soro albumina bovina - BSA 3% (anexo 3), por meia hora. Em seguida, os mesmos foram incubados em anticorpo primário diluído em solução diluidora específica de anticorpo (Antibody Diluent, Dako[®] S3022 – Carpinteria/CA, USA), em câmara úmida, a 4° C, durante 18 horas (*overnight*). A diluição utilizada neste teste foi 1:50 para ambos os anticorpos. Na seqüência, empregou-se o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB, Dako[®] K0690 – Carpinteria/CA, USA) e o cromógeno diaminobenzidina-peroxidase (DAB-peroxidase, Dako[®] K3468 - Carpinteria/CA, USA). Após a revelação, as

lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer e montadas com resina sintética e lamínulas histológicas.

O segundo teste (T2) foi realizado em esfregaço tipo *squash*, semelhante ao utilizado em exames citológicos. Repetiu-se o bloqueio da peroxidase endógena, o método EDTA em pH 8,0, por 30 minutos, no banho-maria à 95°C e testou-se o tampão citrato em pH 6,0, por 30 minutos, também em banho-maria à 95°C. As etapas subseqüentes neste teste foram semelhantes ao T1.

O terceiro teste (T3) compreendeu lâminas com material obtido da homogeneização da papa de leucócitos retirada de um capilar de microhematócrito. Centrifugou-se o capilar, como realizado para a leitura de hematócrito e, em seguida, o mesmo era quebrado na extremidade da papa de leucócitos. Esta foi sobreposta à lâmina e apenas homogeneizada, obtendo-se assim um campo de esfregaço menor que o *squash*. Foi realizado o mesmo processo utilizado no T2, alterando-se apenas o tempo de incubação da BSA 3%, que foi de uma hora.

No quarto teste (T4), as lâminas contendo material obtido a partir da papa de leucócitos foram submetidas apenas à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0, por 30 minutos, em banho-maria à 95°C. Neste teste, para verificar a possibilidade de exclusão desta etapa, duas lâminas não foram submetidas à recuperação antigênica. Antes deste processo, todas foram submetidas ao bloqueio da enzima peroxidase endógena, em H₂O₂ 5%, por 20 minutos. Neste teste, além da incubação em BSA 3%, realizou-se a incubação das lâminas em solução de leite desnatado (anexo 4), por meia hora.

O quinto teste (T5) consistiu da adaptação da técnica universal de contagem total de leucócitos, diluindo em tubos 100µl das amostras de sangue em 2000µl de Líquido de Türk, os quais foram, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e utilizado o sedimento, sendo este homogeneizado no tubo e aspirado em pipetas hematimétricas.

O conteúdo aspirado foi então distribuído em lâminas histológicas de extremidade fosca e silanizadas (anexo 5), em uma área de formato ovalado, de aproximadamente 2 cm de diâmetro e previamente delimitada com caneta hidrofóbica. Seqüencialmente realizou-se a homogeneização do sedimento nas lâminas, aguardando-se a secagem.

Procedeu-se então a lavagem das lâminas em água corrente por 10 minutos, seguida pela recuperação antigênica em solução tampão citrato pH 6,0, por 30 minutos à 95°C em banho-maria. Subseqüentemente, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ 5%, em dois banhos de 10 minutos cada. Em seguida, o material foi novamente lavado por cinco minutos em água corrente e submerso durante cinco minutos em solução tampão de TRIS pH 7,4 (anexo 6).

Para bloquear a marcação inespecífica, instilou-se BSA 3% sobre as lâminas, permanecendo por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram novamente submetidas à lavagem em solução tampão de TRIS por cinco minutos e posteriormente submersas em solução de leite desnatado por 30 minutos.

Em seguida, as mesmas foram incubadas com anticorpo primário diluído em solução diluidora específica de anticorpo (Antibody Diluent, Dako® S3022 – Carpinteria/CA, USA), em câmara úmida, a 4° C, durante 18 horas (*overnight*). As diluições utilizadas estão representadas no Quadro 2.

QUADRO 2- Diluições utilizadas dos anticorpos anti-CD3 (anti-panT) e anti-LB (anti-panB)

Anticorpo	Diluições utilizadas
CD3 (MM1A)* - anti-panT	1: 100
LB (LCTB16A)* - anti-panB	1:50

* anticorpo de marcação de membrana celular.

Na seqüência, instilou-se sobre as lâminas o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB, Dako® K0690 - Carpinteria/CA, USA), em duas etapas de 30 minutos, em câmara úmida e à temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada em solução de diaminobenzidina-peroxidase (DAB-peroxidase, Dako® K3468 - Carpinteria/CA, USA), durante cinco minutos. A solução de TRIS foi utilizada nas lavagens entre as etapas. O material foi então contra-corado com hematoxilina de Mayer

por 30 segundos e as lâminas montadas com resina sintética e lamínulas histológicas.

Para a leitura das lâminas foi adaptado o procedimento de contagem diferencial de leucócitos descrito por KIMURA et al. (1999), sendo então identificado um total de 100 linfócitos marcados e não marcados. Do total de 100 linfócitos, foi considerado apenas o efetivo de células marcadas, determinando-se o percentual de linfócitos T ou B.

Os valores relativos obtidos nas contagens diferenciais de linfócitos foram transformados em valores absolutos de linfócitos totais, em relação ao número de leucócitos totais. Em seguida, os valores relativos de Linfócitos T e B obtidos nas contagens da imunocitoquímica foram transformados em valores absolutos, em relação ao número de linfócitos absolutos totais, conforme preconizado por AYOUB & YANG (1996).

As fotomicrografias foram obtidas a partir de um microscópio óptico de campo claro (Leica DM 4000B – Wetzlar, Alemanha), acoplado a uma câmera digital (Leica DFC290 – Wetzlar, Alemanha) com programa de captura de imagens (Leica IM50 – Wetzlar, Alemanha).

4.5 Análise estatística

Inicialmente realizou-se a estatística descritiva dos dados, obtendo-se as médias, desvio padrão e coeficiente de variação para todos os parâmetros avaliados, nas diferentes categorias de amostras. Foi calculado o coeficiente de variação para determinar a instabilidade relativa de cada um dos parâmetros avaliados. Após esta avaliação, optou-se por aplicar os testes não-paramétricos para comparação das médias, pelo fato dos dados obtidos não apresentarem uma curva normal de distribuição.

Os grupos para a análise estatística foram compostos da seguinte maneira: 1. Para a avaliação do efeito idade, uniram-se os grupos G1 com G5 e G2 com G6, sendo então comparados com os grupos G3 e G7; 2. Para analisar o efeito sexo, uniram-se os grupos G3 com G5 e G4 com G8; 3. Para a análise das diferentes propriedades, uniram-se os grupos G1 com G2 e G5

com G6. Desta forma, para efeito da análise estatística, os grupos foram assim distribuídos:

- Idade: G1+G5 x G2+G6 x G3 x G7
- Sexo: G3+G5 x G4+G8
- Propriedade: G1+G2 x G5+G6

Para a comparação das médias entre as diferentes faixas etárias, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para comparação entre os diferentes sexos e propriedades, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, ambos ao nível de significância $p < 0,05$ (SAMPAIO, 2007). Estas análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas GraphPad InStat e Excel for Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Imunocitoquímica

No primeiro teste (T1) verificou-se que o esfregaço tipo franja não foi adequado à técnica de imunocitoquímica, visto que o material apresentou-se amplamente disperso sobre as lâminas, resultando em baixa população linfocitária remanescente, o que dificultou a visualização e a contagem celular. Somado a isso, havia intensa marcação inespecífica de fundo devido à grande quantidade de hemácias e ampla dispersão do material sobre as lâminas, o que é indesejável, pois torna-se necessário o emprego de grande quantidade de anticorpo e demais reagentes, onerando a técnica. No teste realizado em panela de pressão, observou-se maior coloração de fundo e desintegração parcial da amostra. A Figura 2 ilustra os resultados obtidos em T1.

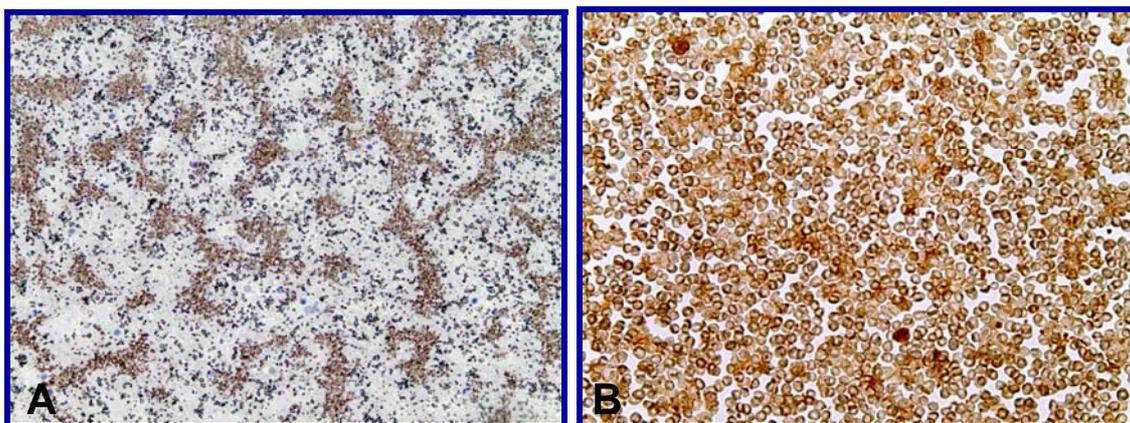


FIGURA 2 - Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino tipo franja. A: Recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria (ICQ, LCTB16A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 200x). B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, panela de pressão (ICQ, LCTB16A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x). Observar ausência de marcação e intensa coloração de fundo em A e B.

O segundo teste (T2) compreendeu o emprego de esfregaço tipo *squash*, na tentativa de se obter maior concentração de linfócitos em um menor campo amostral. Além disso, descartou-se a recuperação antigênica em panela de pressão, pois não se obteve bom resultado com esta em T1, testando-se então o tampão citrato em pH 6,0, por 30 minutos, em banho-maria à 95°C. Os

resultados reiteraram os mesmos inconvenientes do T1. Desta forma, o T2 foi também considerado inadequado à técnica de imunocitoquímica. Os resultados obtidos em T2 são apresentados na Figura 3.

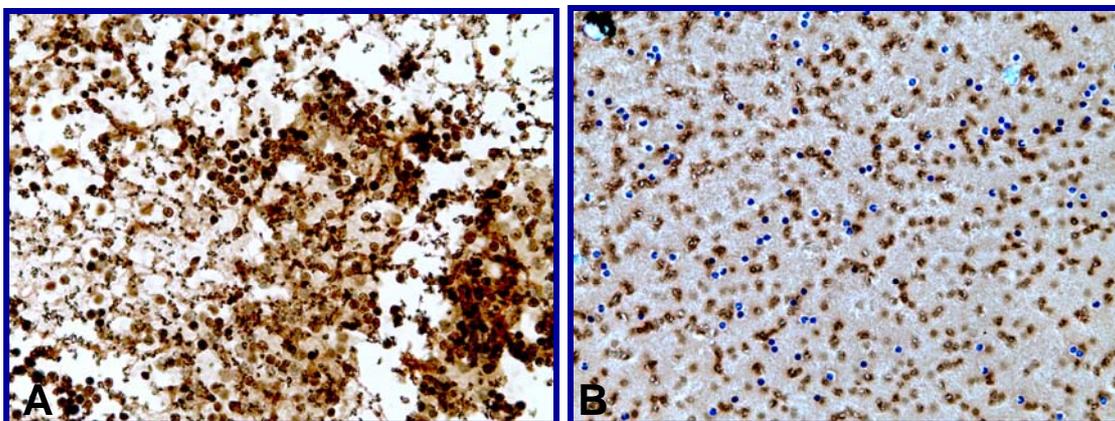


FIGURA 3 - Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino tipo *squash*. A: Recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria, MM1A. B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria, LCTB16A. Observar ausência de marcação e intensa coloração de fundo em A e B. ICQ, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 200x.

No terceiro teste (T3) as lâminas foram confeccionadas com material obtido da homogeneização da papa de leucócitos, retirada de um capilar de microhematócrito. A intenção era conseguir um campo amostral ainda menor que o de T2, assim como maior concentração de linfócitos e menor quantidade de hemácias, sendo que apenas o último objetivo não foi alcançado, pois mesmo utilizando-se a papa de leucócitos alguma quantidade de sangue era disposta nas lâminas no momento da quebra do capilar. Foi aumentado o tempo de incubação em BSA 3% para uma hora, na tentativa de minimizar a marcação inespecífica, entretanto, o propósito não foi alcançado, principalmente nas lâminas submetidas à recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria. Isto dificultou sobremaneira a visualização da marcação celular (Figura 4A). Os resultados obtidos na recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria, foram mais satisfatórios, no entanto, ainda impingia indesejável coloração de fundo (Figura 4B). Portanto, os métodos utilizados no T3 foram considerados ineficientes para qualificá-la como uma boa técnica de imunocitoquímica.

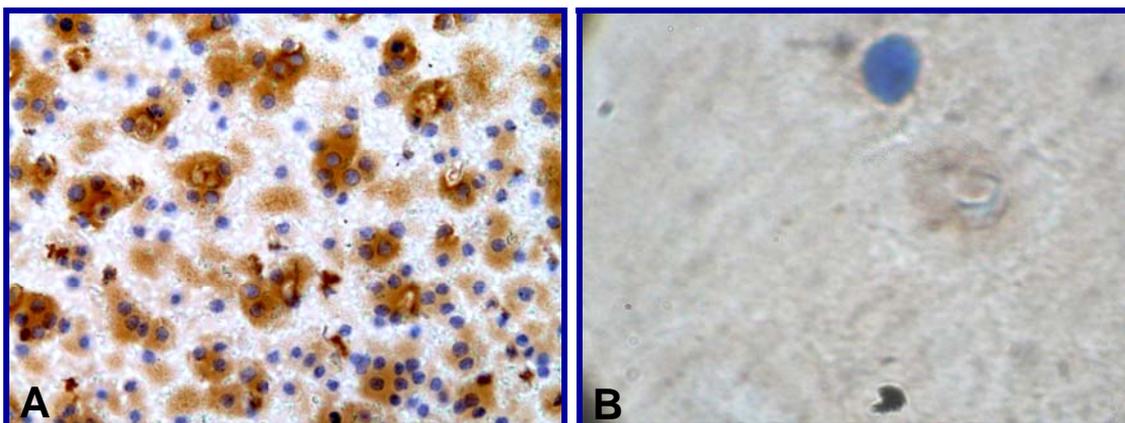


FIGURA 4 - Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino a partir da papa de leucócitos. A: Recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, banho-maria (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x). B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 1000x). Observar intensa coloração de fundo em A e B.

No quarto teste (T4) as lâminas foram dispostas da mesma maneira que do T3, porém excluiu-se a recuperação antigênica em EDTA pH 8,0, pois os resultados obtidos foram insatisfatórios (Figura 4A). Duas lâminas não foram submetidas à recuperação antigênica, objetivando-se melhores resultados na marcação celular com a exclusão desta etapa, no entanto, constatou-se intensa marcação inespecífica (Figura 5A). Na tentativa de eliminação da coloração de fundo, potencializou-se o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando H_2O_2 a 5% e para extinguir a inespecificidade, realizou-se a incubação em solução de leite desnatado, por meia hora, após a incubação em BSA 3% por uma hora. Este fato culminou em relativa melhora na visualização da marcação celular, obtendo-se um campo mais claro e uma menor coloração de fundo, porém ainda indesejada. Apesar da coloração de fundo ainda persistir, pôde-se, com certa dificuldade, observar a presença de marcação celular, sendo necessária assim a obtenção de um melhor campo amostral para contagem celular (Figura 5B).

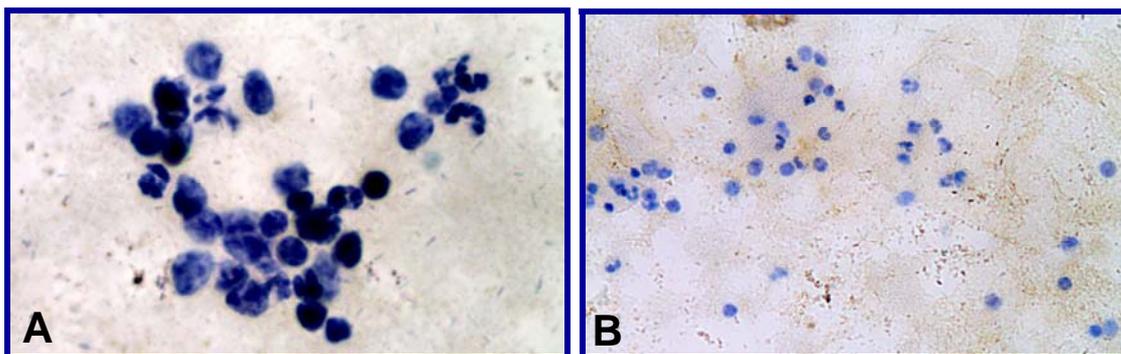


FIGURA 5 - Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de bovino a partir da papa de leucócitos. A: Ausência de recuperação antigênica (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 1000x). B: Recuperação antigênica em citrato pH 6,0, banho-maria (ICQ, MM1A, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x). Observar intensa marcação inespecífica em A e discreta coloração de fundo em B.

O quinto teste (T5) consistiu da adaptação da técnica universal de contagem total de leucócitos, diluindo em tubos 100µl das amostras de sangue em 2000µl de Líquido de Türk, com o objetivo de lisar as hemácias e suprimir a coloração de fundo, potencializando assim a marcação celular. Desta forma, realizou-se a recuperação antigênica em solução citrato pH 6,0 em banho-maria, pois foi a que se mostrou mais eficiente. Com a utilização do Líquido de Türk, os problemas foram em grande parte solucionados, porém, optou-se por manter a passagem das lâminas em H₂O₂ a 5% e leite desnatado, para evitar a permanência de qualquer vestígio que pudesse gerar reação inespecífica e coloração de fundo.

Após o teste de diferentes formas de esfregaço sanguíneo e recuperação antigênica foi possível constatar que o uso do Líquido de Türk e a solução tampão Citrato pH 6,0 em banho-maria (30 minutos a 95°C.) constituiu o melhor método para a realização de imunocitoquímica em amostra sanguínea, para os anticorpos anti-CD3 (MM1A) e anti-LB (LCTB16A), sendo este o procedimento de escolha para todo o material estudado. Os resultados obtidos na padronização da técnica de imunocitoquímica são apresentados na Figura 6.

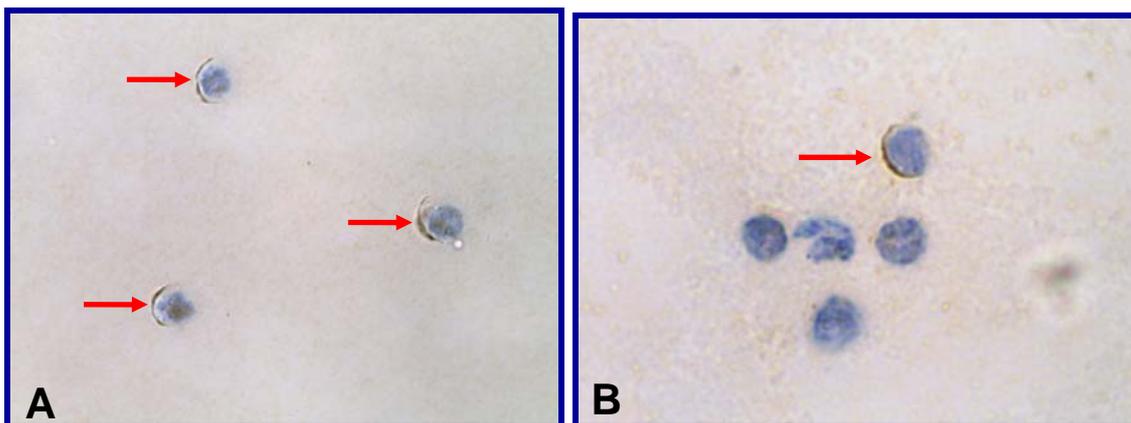


FIGURA 6 - Fotomicrografia de amostras confeccionadas com sangue de bovinos diluídos em Líquido de Türk. A: Linfócito marcado pelo anticorpo monoclonal MM1A (setas vermelhas). B: Linfócito marcado pelo anticorpo monoclonal LCTB16A (seta vermelha). ICQ, LSAB, DAB, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 1000x.

A Figura 7 ilustra a dimensão macroscópica das amostras nas lâminas em T1, T2, T3, T4 e T5.

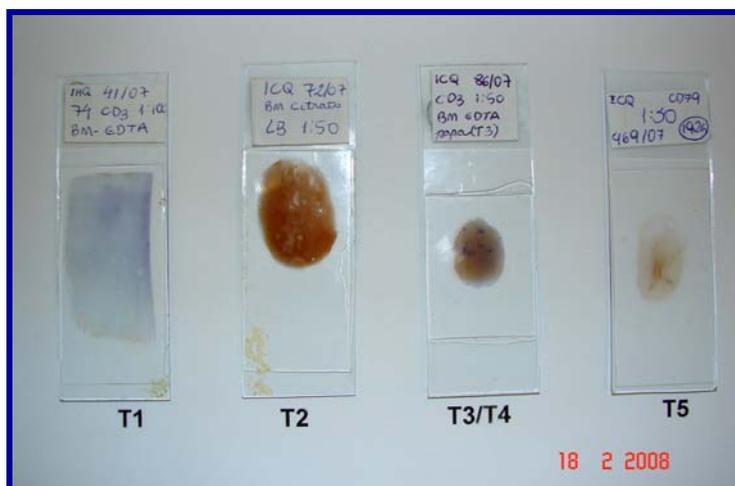


FIGURA 7 - Ilustração macroscópica das lâminas citológicas preparadas pelas diferentes técnicas, com as amostras de esfregaço sangüíneo – T1, *squash* – T2, homogeneização da papa de leucócitos – T3/T4 e diluição em Líquido de Türk – T5.

5.2 Quantificações imunocitoquímica de linfócitos T e B circulantes em valores percentuais e absolutos

5.2.1 Valores percentuais

Foram mensuradas porcentagens de linfócitos T e B, com relação à contagem relativa das células, em todos os grupos.

Os percentuais de células marcadas para os anticorpos anti-CD3 e anti-LB em uma população de 116 bovinos da raça Curraleiro, foram 64 e 32 respectivamente, caracterizando um predomínio de linfócitos T (anti-CD3) em relação aos B (anti-LB) na circulação periférica (Tabela 1).

TABELA 1 - Valores médios, desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (cv) dos percentuais de linfócitos T e B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de 116 bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008

	Linfócitos T – anti-CD3 (%)	Linfócitos B – anti-LB (%)
Média	64	32
s	6	7
cv	10	21

Em relação ao grupo de idade, a porcentagem de linfócitos T foi superior ao de linfócitos B em todas as faixas etárias conforme a Tabela 2.

Observou-se aumento no percentual de linfócitos T e B, do grupo G1+G5 para o grupo G3, bem como nos demais grupos, porém em menor escala (Tabela 2).

TABELA 2 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos percentuais de linfócitos T e B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de fêmeas bovinas saudáveis da raça Curraleiro, conforme a faixa etária – Goiânia, 2008

Grupos		G3	G1 + G5	G2 + G6	G7
		0-1 ano n =22	1-3 anos n =19	>3 anos n =41	≥10 anos n =14
Linfócitos T (%)	média	67 _a	62 _a	64 _a	64 _a
	s	6	6	6	8
	cv	8	9	9	13
Linfócitos B (%)	média	34 _a	27 _b	33 _a	34 _{ab}
	s	5	6	6	7
	cv	15	20	18	21

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre faixas etárias pelo teste de Kruskal - Wallis ($p < 0,05$).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de linfócitos B do grupo G1+G5 em relação aos grupos G3 e G2+G6, caracterizando aumento do número de linfócitos até um ano de idade e, posteriormente, declínio com o avançar da idade (Tabela 2 e Figura 8).

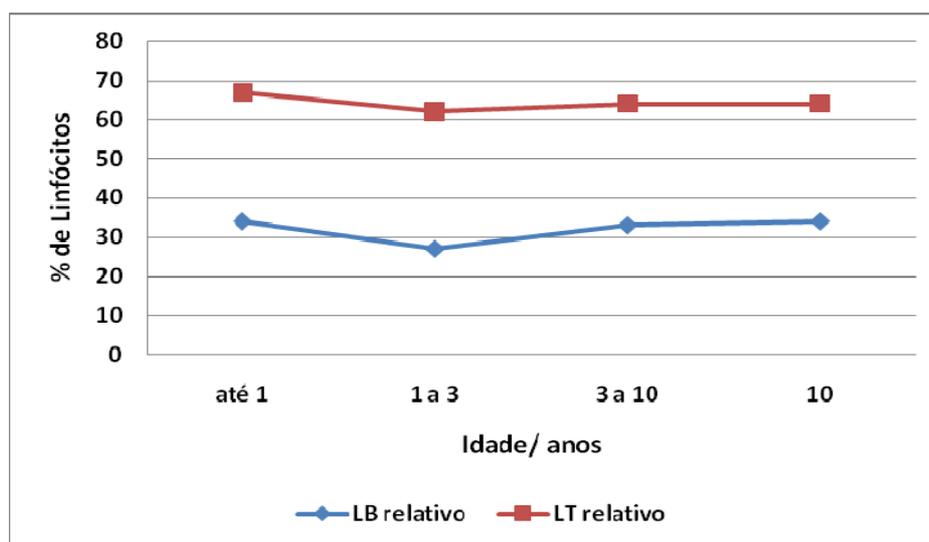


FIGURA 8 - Porcentagens de células marcadas pelos anticorpos anti-CD3 e anti-LB em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, nas diferentes faixas etárias de fêmeas bovinas saudáveis da raça Curraleiro – Goiânia, 2008

Na avaliação do grupo sexo, a porcentagem de linfócitos T foi superior a de linfócitos B, porém, não foi observada diferença significativa entre as porcentagens de linfócitos T e B entre machos e fêmeas (Tabela 3).

TABELA 3 – Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos percentuais de linfócitos T e B em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica de bovinos sadios da raça Curraleiro em função do sexo – Goiânia, 2008

Sexo		Linfócitos T (%)	Linfócitos B (%)
Fêmeas G3+G5 0-1 + 1-3 anos n=31	Média	66 _a	32 _a
	s	6	6
	cv	9	20
Machos G4+G8 0-1 + > 1 ano n=20	Média	64 _a	31 _a
	s	7	8
	cv	11	26
p		0,6432	0,4289

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre sexo, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os resultados referentes ao grupo propriedade mostraram porcentagem maior de linfócitos T em relação ao B. Não foi observada diferença significativa na porcentagem de células entre as propriedades A e B (Tabela 4).

TABELA 4 – Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos percentuais de linfócitos T e B em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro em função das propriedades – Goiânia, 2008

Propriedade		Linfócitos T (%)	Linfócitos B (%)
A G1+G2 1-3 + >3 anos n=25	Média	63 _a	32 _a
	s	7	6
	cv	11	20
B G5+G6 1-3 + >3 anos n=35	Média	63 _a	30 _a
	s	5	6
	cv	8	20
p		0,8220	0,2835

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre propriedades, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

5.2.2 Valores absolutos

Foram mensuradas quatro variáveis leucocitárias em valores absolutos de células: leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B. Obtiveram-se média, desvio-padrão e coeficiente de variação das variáveis de toda a população de bovinos avaliada (Tabela 5), sem separação por grupos, na finalidade de estabelecer um valor de referência de linfócitos T e B para a raça.

TABELA 5 - Valores médios, desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (cv) dos leucócitos ($/\mu\text{L}$), linfócitos totais ($/\mu\text{L}$), linfócitos T ($/\mu\text{L}$) e linfócitos B ($/\mu\text{L}$), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de 116 bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008

	Leucócitos (/μL)	Linfócitos Totais (/μL)	Linfócitos T (/μL)	Linfócitos B (/μL)
média	10.356	6.638	4.292	2.112
s	3.017	2.277	1.602	811
cv	29	34	37	38

Com relação ao grupo formado em função da faixa etária, houve diferença significativa em quase todas as variáveis, com exceção dos leucócitos, como mostra a Tabela 6.

TABELA 6 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos leucócitos ($/\mu\text{L}$), linfócitos totais ($/\mu\text{L}$), linfócitos T ($/\mu\text{L}$) e linfócitos B ($/\mu\text{L}$), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro, conforme a faixa etária – Goiânia, 2008

Grupos		G3	G1 + G5	G2 + G6	G7
		0-1 ano n =22	1-3 anos n =19	>3 anos n =41	≥ 10 anos n =14
Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	média	10.714_a	9.989_a	9.298_a	10.021_a
	s	2.195	3.109	2.962	2.650
	cv	20	31	32	26
Linfócitos Totais ($/\mu\text{L}$)	média	7.314_a	6.453_{ab}	5.444_b	5.667_{ab}
	s	1.600	2.054	1.625	1.314
	cv	22	32	30	23
Linfócitos T ($/\mu\text{L}$)	média	4.946_a	4.022_{ab}	3.443_b	3.634_{ab}
	s	1.308	1.280	998	917
	cv	26	32	29	25
Linfócitos B ($/\mu\text{L}$)	média	2.514_a	1.737_b	1.778_b	1.950_{ab}
	s	659	542	582	710
	cv	26	31	33	36

* letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre faixas etárias pelo teste de Kruskal - Wallis ($p < 0,05$).

Observou-se maior número de linfócitos totais até um ano de idade e, posteriormente, declínio com o avançar da idade, influenciando no número absoluto de linfócitos T e B, que apresentaram o mesmo padrão de distribuição e diferenças significativas no número de células T e B (Tabela 6 e Figura 9).

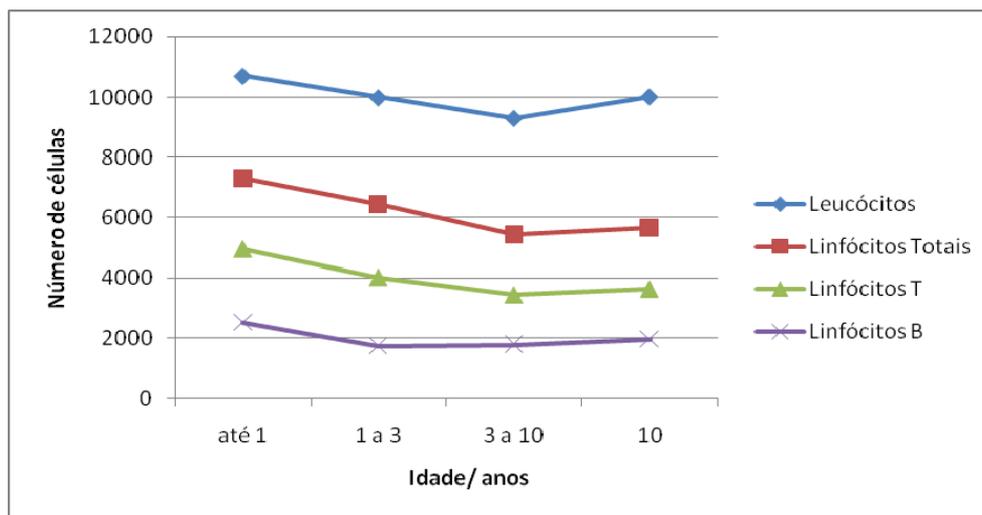


FIGURA 9 - Representação gráfica do número de leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, nas diferentes faixas etárias de fêmeas bovinas sadias da raça Curraleiro, Goiânia, 2008

Na avaliação dos resultados e interpretação da análise estatística das variáveis em função do sexo, observou-se que os valores, com exceção dos linfócitos B, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre machos e fêmeas, sendo que todos os valores encontrados nos machos foram superiores em relação às fêmeas (Tabela 7 e Figura 10).

TABELA 7 – Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos leucócitos ($/\mu\text{L}$), linfócitos totais ($/\mu\text{L}$), linfócitos T ($/\mu\text{L}$) e linfócitos B ($/\mu\text{L}$), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de bovinos sadios da raça Curraleiro em função do sexo – Goiânia, 2008

Sexo		Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	Linfócitos Totais ($/\mu\text{L}$)	Linfócitos T ($/\mu\text{L}$)	Linfócitos B ($/\mu\text{L}$)
Fêmeas G3+G5 n=31	Média	10.848 _a	7.268 _a	4.794 _a	2.311 _a
	s	2.757	1.858	1.330	692
	cv	25	26	28	30
Machos G4+G8 n=20	Média	12.715 _b	9.198 _b	6.031 _b	2.824 _a
	s	2.946	2.566	1.946	1.021
	cv	23	28	32	36
p		0,021	0,0053	0,0191	0,1159

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre sexo, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Houve diferença de aproximadamente 2.000 células nos valores de leucócitos, linfócitos totais e linfócitos T dos machos em relação às fêmeas, onde foram observadas diferenças significativas (Tabela 7 e Figura 10).

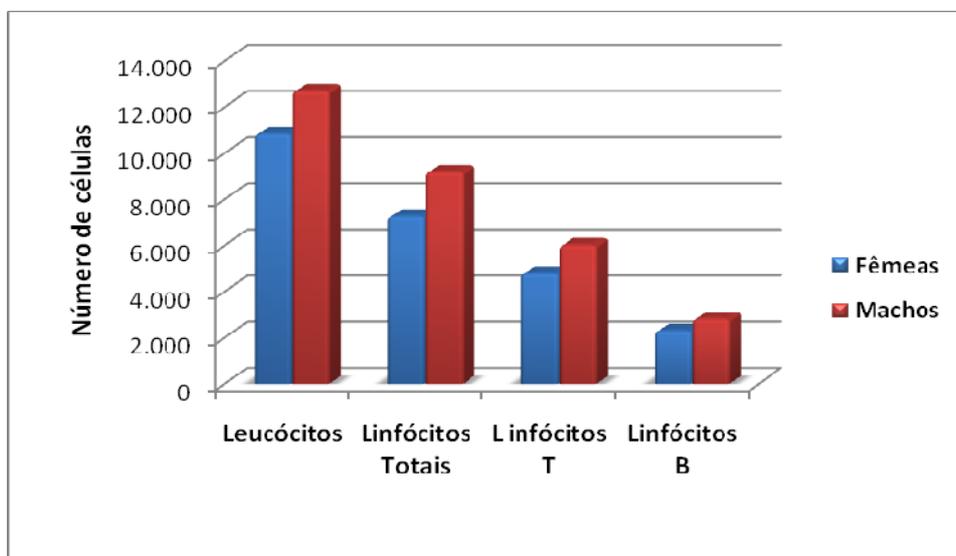


FIGURA 10 -Representação gráfica do número de leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B, em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de acordo com o sexo de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008

Quanto aos valores encontrados nas comparações das diferentes propriedades, não foi observada diferença significativa em nenhuma das variáveis relacionadas (Tabela 8).

TABELA 8 – Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv) e avaliação estatística dos leucócitos (/ μL), linfócitos totais (/ μL), linfócitos T (/ μL) e linfócitos B (/ μL), em sangue periférico, submetidos à técnica de imunocitoquímica, de bovinos sadios da raça Curraleiro em função das propriedades – Goiânia, 2008

Propriedade		Leucócitos (/ μL)	Linfócitos (/ μL)	Linfócitos T (/ μL)	Linfócitos B (/ μL)
A G1+G2 n=25	Média	8.664 _a	5.608 _a	3.533 _a	1.790 _a
	s	2.029	1.590	1.044	592
	cv	23	28	30	33
B G5+G6 n=35	Média	10.126 _a	5.875 _a	3.692 _a	1.747 _a
	s	3.436	1.978	1.177	554
	cv	34	34	32	32
p		0,2	0,66	0,57	0,74

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre propriedades, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os dados numéricos de cada animal referentes a todas as variáveis laboratoriais estudadas estão dispostos no Anexo 7.

6 DISCUSSÃO

6.1 Imunocitoquímica

Enquanto a imunoistoquímica localiza sítios antigênicos em componentes teciduais, a imunocitoquímica os aponta em células obtidas a partir de fluidos corpóreos, aspirados celulares e *imprint* (CHEMICON, 2006). Assim como a técnica de detecção de epítomos aplicada a tecidos, o método direcionado a esse propósito em células isoladas requer qualidade do exame e otimização de custos. Neste sentido, a padronização das amostras e dos anticorpos a serem utilizados é de fundamental importância para a realização da imunocitoquímica, especialmente em Medicina Veterinária. Por essa razão, a padronização foi realizada neste estudo, obtendo-se melhores resultados quando realizada apenas a homogeneização de uma gota de amostra na lâmina, diminuindo assim o tamanho do campo e, conseqüentemente, obtendo maior concentração celular em um espaço relativamente pequeno.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pôde-se observar que, o tamanho do esfregaço em testes imunocitoquímicos é muito importante, uma vez que os anticorpos utilizados são relativamente onerosos, especialmente no âmbito da pesquisa em tecidos animais. Logo, os testes T1 e T2 foram descartados pela extensão do esfregaço que necessitava de grande quantidade de anticorpo primário e demais reagentes, além da pequena concentração de linfócitos por campo, dificultando assim a contagem dos mesmos.

Outro grande entrave foi a peroxidase endógena devido à grande quantidade de hemácias, condição esta marcante nas amostras sanguíneas de T1 e T2. A coloração de fundo é um dos problemas mais comuns em imunocitoquímica, podendo prejudicar seriamente a interpretação da reação e até culminar em resultados falso-positivos (RAMOS-VARA, 2005). De acordo com este mesmo autor, a peroxidase endógena presente naturalmente em hemácias e a biotina endógena dos tecidos de mamíferos podem reagir com a peroxidase adjuvante ao cromógeno (DAB) e com a biotina do complexo secundário, produzindo coloração marrom indistinguível daquela específica

esperada. Salieta ainda que esta coloração inespecífica pode ser minimizada potencializando a concentração da H_2O_2 e utilizando solução de leite desnatado.

Na tentativa de concentrar a população de leucócitos por campo e diminuir a quantidade de hemácias, utilizou-se o capilar de hematócrito em T3 e T4, sem sucesso, já que a quantidade de hemácias ainda era significativa, resultando em coloração de fundo, mesmo potencializando-se o bloqueio da peroxidase endógena com o uso de a H_2O_2 em 5% conforme sugere RAMOS-VARA (2005).

Optou-se então por testar o Líquido de Türk, que é utilizado rotineiramente na técnica de contagem total de leucócitos, pois, segundo THRALL et al. (2006), este possui componente de lise de hemácias e plaquetas. Com a lise das hemácias, os problemas com a peroxidase endógena foram, em grande parte, solucionados, mas optou-se por manter a passagem das lâminas em H_2O_2 a 5% e em leite desnatado, para evitar a ocorrência de coloração de fundo e de reação inespecífica, respectivamente. Apesar disso, não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando o Líquido de Türk em imunoistoquímica ou imunocitoquímica. De outra parte, HARBO et al. (2004), KOO et al. (2004) e RAJ et al. (2007), utilizaram solução de ácido citrato dextrose (ACD) para coleta do sangue periférico e, em seguida, misturaram com solução cinco volumes de tampão TRIS e NH_4Cl à 0,87% para lise das hemácias, porém este método foi utilizado na citometria de fluxo.

De acordo com RAMOS-VARA (2005), o grau de recuperação antigênica é dependente de inúmeros fatores, como temperatura, tempo de aquecimento e pH da solução utilizada. Apesar de alguma disponibilidade comercial acerca das soluções tampão, segundo SHAN-RONG et al. (2001), não há uma solução plenamente efetiva à abertura de todos sítios antigênicos ou sequer um único método de recuperação que seja ótimo e comum a todos os anticorpos. Assim, é necessário testar diferentes métodos e soluções na etapa da recuperação antigênica, padronizando aqueles que melhor se adaptam aos antígenos de interesse particular, o que, neste caso, ocorreu com a recuperação em banho-maria associada ao tampão citrato pH 6,0, semelhante ao método sugerido por RAMOS-VARA (2005).

Com relação aos anticorpos testados, DAVIS et al. (1993) e MIYAZAWA et al. (2006) afirmaram que o anticorpo MM1A possui a proteína CD3 como marcador, ou seja, um anticorpo anti-CD3 pan-T, que identifica todos os tipos de linfócitos T. HARBO et al. (2004), definiram que os CDs equivalentes às moléculas identificadas pelo anticorpo LCTB16A ainda não foram determinadas, sendo assim classificado como um anticorpo de linhagem específica de células B. Por isso, a escolha desses marcadores para a determinação dos linfócitos T e B circulantes nos bovinos deste experimento.

Inúmeros autores referenciaram o anticorpo anti-CD3 (MM1A) para a identificação da população de linfócitos T em diferentes tecidos corpóreos (KRUGER et al., 2003; PINCHUK et al., 2003; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2004; HARBO et al., 2004; KOO et al., 2004; PESSA-MORIKAWA et al., 2004; BREATHNACH et al., 2005; MIYAZAWA et al., 2006; CANNON et al., 2007; NIKU et al., 2007; RAJ et al., 2007), entretanto, todos utilizaram a citometria de fluxo como método imunológico para esta detecção, enquanto BARRINGTON et al. (1997), HILL et al. (2002), YASUDA et al. (2006) e MILNES et al. (2007), utilizaram o MM1A na imunocitoquímica. Contudo, os resultados da presente pesquisa também o apontam como um marcador pan-T útil através da imunocitoquímica, não sendo encontrados na literatura disponível trabalhos reportando a utilização deste anticorpo associada a este método.

Situação de originalidade semelhante foi observada quanto ao anticorpo LCTB16A, que foi aqui utilizado como marcador pan-B por meio da imunocitoquímica. Os resultados apontaram sua eficiência em determinar linfócitos B circulantes de bovinos da raça Curraleiro, também não sendo encontradas descrições na literatura sobre sua utilização em imunocitoquímica, apenas em citometria de fluxo, apesar de haver indicação do fabricante para uso em imunocitoquímica. Ainda, acerca da utilização deste anticorpo em citometria de fluxo, DAVIS et al. (1996) e HARBO et al. (2004), o utilizaram por meio desta técnica, porém não obtiveram sucesso.

6.2 Quantificações imunocitoquímica de linfócitos T e B circulantes em valores percentuais e absolutos

Os valores médios do percentual de linfócitos T e B circulantes, encontrados neste trabalho, foram 64 e 32 respectivamente, demonstrando uma superioridade de linfócitos T em relação aos linfócitos B na circulação, o que também foi observado por PARK et al. (1992), BITTAR et al. (2004) e PESSA-MORIKAWA et al. (2004). Vale ressaltar que os dois últimos autores citados ainda subclassificaram a população de linfócitos T, em citotóxicos, auxiliares e linfócitos $T\gamma\delta$, o que não foi propósito desta pesquisa. Apesar disso, os resultados por hora obtidos abrem novos horizontes de estudo neste sentido, considerando bovinos da raça Curraleiro.

No entanto, PARK et al. (1992) encontraram um percentual de aproximadamente 45 a 53 linfócitos T e 16 a 21 linfócitos B em bovinos Holstein-Friesian, demonstrando quantidades máximas inferiores de células T e B quando comparadas àquelas encontradas nos bovinos Curraleiros desta pesquisa. KIMURA et al. (1999) encontraram média de 47,4% de linfócitos T em vacas Jersey adultas, cerca de 13 dias antes do parto e observaram um aumento neste valor para 49,8%, 13 dias após o parto, mostrando, da mesma maneira, uma média de linfócitos T inferior à média encontrada nos bovinos Curraleiros.

Também BITTAR et al. (2004) identificaram diferentes perfis fenotípicos de linfócitos T e B circulantes em bovinos de origem européia, considerando animais das raças Hereford, Pardo Suíça e Holandesa. Esses autores obtiveram um total de linfócitos T de 65,8%, 56,9% e 43,1% para essas raças, respectivamente, sendo que o percentual de células T da raça Hereford é semelhante ao observado nos Curraleiros. Quanto aos linfócitos B, foram encontrados um total de 14,9% nas Hereford e Pardo Suíça, e 18,58% na Holandesa, que compreendem valores bem inferiores aos encontrados nos bovinos deste estudo. Tal dessemelhança nos valores totais de linfócitos B pode ser explicada pelo fato de BITTAR et al. (2004) terem utilizado o anticorpo anti-CD21 na imunofenotipagem da linhagem B, que não corresponde a um marcador pan-B, ou seja, não detecta linfócitos em todas as fases de

maturação. Já o anticorpo LCTB16A ora utilizado reconhece linfócitos de blastos a citos.

Ainda, também BITTAR et al. (2004) sugeriram que o perfil fenotípico do sangue periférico dos bovinos europeus pode influenciar no padrão da imunidade clínica apresentado pelos animais, pois acreditam que o menor nível de linfócitos T (CD4 e CD8) em animais da raça Holandesa pode estar associado à sua susceptibilidade a infecções por *Babesia*, enquanto maiores níveis de linfócitos T podem estar associados à maior resistência da raça Hereford para infecções parasitárias. Fundamentado nesse raciocínio, parece coerente que isso possa ser extrapolado aos animais da raça Curraleiro, visto que estes apresentaram alto nível de linfócitos T circulantes e são animais que sabidamente apresentam maior resistência à infecções hemoparasitárias.

Além do alto nível de linfócitos T circulantes, esses mesmos autores ainda inferiram que a proporção de linfócitos T e B circulantes também pode estar envolvida na imunidade clínica, sendo que animais com maior proporção T:B apresentam maior resistência às hemoparasitoses, o que ocorreu com bovinos da raça Curraleiro.

Assim, acerca dos valores percentuais de linfócitos T e B circulantes parece clara a diferença no perfil linfocitário de bovinos de diferentes raças, particularmente entre as de origem européia.

As médias dos valores absolutos das variáveis estudadas dos 116 bovinos avaliados neste estudo são similares aos valores absolutos médios encontrados por PAULA NETO (2004), o qual avaliou parâmetros leucocitários de uma população de bovinos Curraleiros.

Nos resultados obtidos de acordo com o grupo idade, observou-se um aumento do número de linfócitos até um ano de idade e, posteriormente, um declínio com o avançar da idade. Este comportamento refletiu tanto na dinâmica do número absoluto como no percentual de linfócitos T e B, apresentando o mesmo padrão de distribuição, visto que animais em crescimento apresentam índices linfocitários mais elevados que os adultos, pois neles a atividade imunogênica é mais intensa (JAIN, 1993; MORRIS & LARGE, 1993; GARCIA-NAVARRO et al., 1994; PAULA NETO, 2004).

Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por PAULA NETO (2004), com bovinos da raça Curraleiro, em que houve diferença significativa no número absoluto de linfócitos entre as faixas etárias. O mesmo foi observado por BIRGEL JÚNIOR et al. (2001) e COSTA et al. (2000), em trabalho realizado com fêmeas bovinas das raças Jersey e Nelore, onde o número de linfócitos aumentou, de forma significativa e gradativa, do nascimento até 12 meses de idade e diminuiu a partir da puberdade. CANFIELD (1994), COSTA (1994), COLE et al. (1997), FAGLIARI et al. (1998), MONKE et al. (1998), KNOWLES et al (2000) e GONÇALVES et al. (2001), também observaram uma baixa contagem de linfócitos ao nascimento, com um considerável aumento após os primeiros dias de vida. O mesmo não foi observado por PEIXOTO et al. (2002), que não encontrou diferença significativa no número de linfócitos em grupos de bovinos holandeses de 30 dias e três meses, sendo essa disparidade possivelmente relacionada à faixa etária dos grupos envolvidos na pesquisa desses autores, que compreendeu animais em fase de crescimento, onde os valores leucocitários tendem a permanecer estáveis e em altos níveis até o início da idade adulta.

Segundo WYATT et al. (1994), KULBERG et al., (2004) e KAMPEN et al. (2006), bezerras e novilhas apresentam maiores valores absolutos de linfócitos no sangue periférico que os animais adultos, e os bezerras geralmente possuem alta proporção de linfócitos T que expressam TCR $\gamma\delta$, comparado aos animais mais velhos.

De acordo com JAIN (1993), a diminuição do número de linfócitos com a idade é atribuída ao declínio primário de linfócito T, em razão da diminuição da função do timo, sendo que o número de linfócitos B permanece relativamente estável, o que ocorreu neste estudo, pois houve discreta queda no número de linfócitos B, enquanto ocorreram quedas bruscas de linfócitos T entre as faixas etárias.

AYOUB & YANG (1996) realizaram estudo comparando mudanças nas sub-populações de linfócitos T e B em diferentes faixas etárias de bovinos, e verificaram que as contagens absolutas de linfócitos até os seis meses de idade permaneceram elevadas e semelhantes em todos os animais avaliados. Após este período, as contagens absolutas de linfócitos variaram significativamente, sendo que o número de linfócitos T declinou a partir de 7 a 8

meses de idade, como o esperado, o que também foi observado por WILSON et al. (1996), KULBERG et al. (2004) e KAMPEN et al. (2006). Porém, ainda no estudo de AYOUB & YANG (1996), o número de linfócitos B aumentou gradativamente, sendo que as causas da ocorrência desta linfocitose persistente não foram esclarecidas, pois todos os animais estavam clinicamente saudáveis.

Já MUSCOPLAT et al. (1974), citado por AYOUB & YANG (1996), descreveram que animais saudáveis apresentam apenas 28% da população de linfócitos B no sangue periférico, enquanto este número aumenta para 63% em animais com linfocitose, o que não sustenta o dado encontrado por AYOUB & YANG (1996) em animais saudáveis, porém estando em similaridade com a população de linfócitos B encontradas neste trabalho.

Em estudo realizado por MIRSKY et al. (1996), em vacas saudáveis, os autores também observaram diminuição do número absoluto e percentual de linfócitos totais e linfócitos B com o avançar da idade, estando em similaridade com os resultados aqui obtidos.

MENGE et al. (1999) e KAMPEN et al. (2006) encontraram menores valores de linfócitos B em bezerros recém-nascidos, quando comparados com animais de outras faixas etárias, sendo que a proporção de linfócitos B aumentou rapidamente nas primeiras semanas de vida. KAMPEN et al. (2006) concluíram que um aumento no número absoluto de linfócitos em bezerros de 9 a 11 semanas de idade, ocorre principalmente devido a um aumento no número de linfócitos B e linfócitos T CD4+.

WYATT et al. (1994) e WILSON et al. (1996) verificaram que a distribuição de alguns tipos de linfócitos na circulação periférica possui variação em fetos e bezerros, assim como grandes diferenças em adultos, encontrando maiores porcentagens de linfócitos na circulação em jovens que em adultos.

Com relação às variáveis estudadas em função do sexo, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre machos e fêmeas, sendo que os valores encontrados nos machos foram superiores em relação às fêmeas. Acerca disso, PAULA NETO (2004) também verificou que os machos apresentaram valores de leucócitos e linfócitos superiores aos das fêmeas, relatando que o sexo é um dos fatores de influência no leucograma de bovinos da raça Curraleiro. Em contrapartida, BIONDO (1998) e BENESI et al. (2002)

não observaram influência do fator sexo no eritrograma e/ou leucograma de bovinos, com a ressalva de que esses autores trabalharam com animais da raça Nelore.

Do mesmo modo, PESSA-MORIKAWA et al. (2004) verificaram que as porcentagens de todas as sub-populações de linfócitos T nos machos foram maiores que 80%, sendo superiores às das fêmeas. WILSON et al. (1996) também observou diferenças entre as populações linfocitárias de fêmeas e machos, porém encontrou maior quantidade de linfócitos T CD2+ (células T $\gamma\delta$ maduras) em vacas que em touros, sendo de 66 e 52%, respectivamente. Entretanto, não encontrou diferença significativa nas demais sub-populações de linfócitos T (CD4 e CD8) em machos e fêmeas.

No presente estudo, compararam-se os perfis linfocitários relativo e absoluto dos animais de duas propriedades diferentes. Avaliando as médias das variáveis estudadas, verificou-se que os valores de linfócitos T e B não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), apesar da ocorrência de infestação de carrapatos e mosca do chifre, ausência de suplementação mineral e escore corporal baixo dos animais da propriedade B. Estas variáveis não foram observadas na propriedade A. Possivelmente, a menor condição corporal observada nos animais da propriedade B tenha como causas determinantes o manejo nutricional e sanitário inadequados, o que, de acordo com os resultados, não interferiu na imunidade celular e humoral desses bovinos.

De acordo com MORRIS & LARGE (1993), moléstias riquetsiais e desnutrição podem causar linfopenia, por desencadear aumento na liberação de glicocorticóides, o que interfere diretamente na produção de linfócitos. Apesar desta evidência, no presente trabalho, não foi observada diferença significativa no número de células dos animais das diferentes propriedades ou sequer algum bovino com linfopenia. Este resultado pode ser sustentado pela rusticidade dos Curraleiros e por uma provável resistência natural desses as condições adversas e hostis às quais são submetidos, pois conforme descrito por BARINI (2007); CARVALHO & AMORIM (1989), MARIANTE & CAVALCANTE, (2000), PAULA NETO (2004) e JULIANO (2006), a raça Curraleiro formou-se em regime de criação super extensiva, com mínimos cuidados sanitários e alimentares. Além disso, a raça adaptou-se ao calor e à

seca, o que resultou, com o passar dos séculos, em animais extremamente rústicos, com características de boa adaptação ao meio e maior resistência a doenças e parasitas.

BITTAR et al. (2004) afirmaram ainda que, a existência de um perfil fenotípico diferencial de linfócitos circulantes em animais das raças Holandesa, Pardo-Suíça e Hereford deve ser considerada nos estudos da imunidade celular desencadeada por doenças infectoparasitárias em bovinos, uma vez que essas diferenças podem ser relevantes para o padrão de resposta imune apresentado por esses animais. Esta afirmação demonstra a importância da presente investigação para a compreensão do perfil imunológico de bovinos da raça Curraleiro, além de servir como passo inicial para explicar as características de rusticidade e resistência desses animais à doenças infectoparasitárias.

CUENCA et al. (2007), em pesquisa envolvendo bezerros e vacas com idades de três a seis meses e quatro a oito anos, respectivamente, acometidos por desnutrição provocada por intensa seca regional constataram linfocitose em todos os bezerros e em 92% das vacas investigadas, concluindo ser uma resposta do organismo frente a um estresse nutricional, neste caso ocasionado pela intensa seca. Contrariamente ao encontrado por estes autores, nos resultados do presente estudo não foi observada nenhuma alteração leucocitária nos bovinos Curraleiros da propriedade B, que também estavam submetidos a um estresse nutricional intenso.

Por outro lado, os mesmos autores descrevem que as vacas que não apresentaram alterações linfocitárias (8%), compreendiam animais mais velhos e possivelmente apresentavam maior adaptabilidade às condições desfavoráveis. Isto é parcialmente semelhante ao observado na pesquisa em tela, em que não se verificou alterações leucocitárias nos animais das diferentes faixas etárias, provavelmente pela rusticidade da raça associada à alta adaptabilidade, especialmente dos animais mais velhos.

Também MEGLIA et al. (2005) realizaram trabalho comparando diferentes dietas e suas conseqüências junto ao perfil leucocitário de bovinos. Observaram que o número de leucócitos e linfócitos foi maior nos animais que receberam menores quantidades de energia, contrastando com os resultados obtidos no presente estudo, onde independente das condições alimentares, o

perfil leucocitário manteve-se estável e dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie. Da mesma forma OLIVEIRA et al. (2005) não verificaram alterações leucocitárias alterando a dieta de bovinos.

A ausência de linfopenia e linfocitose nos animais da propriedade B pode estar relacionada à resistência adquirida ao longo dos séculos, ou seja, mesmo na presença de uma quantidade moderada de carrapatos e diferentes manejos nutricionais, o perfil linfocitário não foi alterado, talvez pela alta proporção de linfócitos T verificada, como também ocorreu com os bovinos Hereford do estudo de BITTAR et al. (2004). Neste sentido, ressalta-se novamente a rusticidade como fator preponderante de resistência à infecções, particularmente as hemoparasitárias, dadas as diferenças ambientais e nutricionais entre os animais do estudo do autor supracitado e os deste experimento.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi desenvolvido, pode-se concluir que:

1. A utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD3 bovino (MM1A) e anti-LB bovino (LCTB16A), por meio da imunocitoquímica em amostras de sangue periférico de bovinos, foi bem sucedida, permitindo a sua indicação para a imunofenotipagem de linfócitos T e B circulantes.
2. As variáveis linfocitárias dos bovinos da raça Curraleiro sofreram significativas influências dos fatores etários e sexuais.
3. O aumento da idade infere em diminuição dos níveis de leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B.
4. O sexo interferiu nos valores absolutos do número de leucócitos, linfócitos totais e linfócitos T que foram maiores nos machos em relação às fêmeas.
5. A diferença de qualidade de manejo não influenciou nenhum dos parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

1. ALLEN, D. M. Suckler Herds. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine Medicine – Diseases and Husbandry of Cattle**. Cambridge: Blackwell Science Ltd, 1992. 922p.
2. ARNETT K. L.; HARRISON, S. C.; WILEY, D. C. Crystal structure of a human CD3- ϵ/δ dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington., v.101, n.46, p.16268-16273, 2004.
3. ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**, 6 ed. São Paulo: Ed. Melhoramentos, 1958. 818p.
4. AYOUB, I. A.; YANG, T. J. Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 20, n.5, p.353-363, 1996.
5. AYRES, M. C. C. **Eritrograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1758) da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo: influência de fatores etários, sexuais e do tipo racial**. 1994. 204f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
6. BALESTIERI, F. M. P. **Imunologia**. Barueri: Manole, 2006. 840p.
7. BARINI, A. C. **Bioquímica sérica de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro de diferentes idades**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, UFG.

8. BARRINGTON, G. M., BESSER, T. E.; DAVIS, W. C.; GAY, C. C.; REEVES, J. J.; McFADDEN, T. B. Expression of Immunoglobulin G1 Receptors by Bovine Mammary Epithelial Cells and Mammary Leukocytes. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.80, n.1, p.86-93, 1997.
9. BENESI, F. J., COSTA, J. N., BIRGEL, E. H., D'ANGELINO, J. L., AYRES, M. C. C., FILHO, I. R. B. Leucograma padrão de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). Influência de fatores sexuais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.8, n.1, p.59-66, 2002.
10. BIONDO, A. W.; LOPES, S. T. A., KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; ALENCAR, N. X. Hemograma de bovinos (*Bos indicus*) sadios da raça nelore no primeiro mês de vida, criados no estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.2, p.251-256, 1998.
11. BIRGEL, E. H. **Hematologia clínica veterinária**. In: BIRGEL, E. H., BENESI, F. J. Patologia Clínica Veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p. 2-34, 1982.
12. BIRGEL, E. H., D'ANGELINO, J. L., BARROS FILHO, I. R., AYRES, M. C. C., BENESI, F. J. COSTA, J. N. Eritrograma dos bovinos da raça Canchim, criados no Estado de São Paulo. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v.19, n.1, p.23-27, 1997.
13. BIRGEL JR., E. H. **O hemograma de bovinos (*Bos taurus*, Linnaeus, 1758), da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo**. 1991. 172f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
14. BIRGEL JR., E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J., BIRGEL, E. H. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados

- no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.38, n.3, p.136-141, 2001.
15. BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.1, p.107-110, 2004.
16. BOAVENTURA, V. M.; FIORAVANTI, M. C. S. JULIANO, R. S. **Gado Curraleiro: relação dos criadores e aspectos gerais da raça**. Goiânia: Sebrae-GO, 2005, 80p.
17. BREATHNACH, C.C.; SOBOLL, G.; SURESH, M.; LUNN, D. P. Equine herpesvirus-1 infection induces IFN- γ production by equine T lymphocyte subsets. **Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam**, v.103, n1, p.207–215, 2005.
18. BRITTO, C. M. C. **Citogenética do gado Pé-duro**. Teresina: EDUFPI. 1998. 94p.
19. CALL, M. E.; WUCHERPFENNIG, K. W. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor–CD3 complex. **Molecular Immunology**, Oxford, v.40, n.18, p.1295–1305, 2004.
20. CALL, M. E.; WUCHERPFENNIG, K. W. The T cell receptor: Critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v.23, p.101–25, 2005.
21. CAMARGO, A. H. A. A necessidade de preservar e selecionar o gado crioulo. **Dirigente Rural**, São Paulo, maio, p. 26-31. 1984.
22. CANFIELD, P. J. Normal haematological and biochemical values for the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) in Australia. **Australian Veterinary Journal**, Began, v. 61, n.26, p. 89-93, 1994.

23. CANNON, M. J.; DAVIS, J. S.; PATE, J. L. Expression of costimulatory molecules in the bovine corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Londres, v.5, n.5, 2007.
24. CARVALHO, J.H. Pé-duro, patrimônio preservado no Piauí. **Dirigente Rural**, São Paulo, p. 26-28. 1985.
25. CARVALHO J. H.; AMORIM G. C. **Preservação e avaliação do gado pé duro**. n.44, 1989 p. 1-5, Embrapa. Teresina (Comunicado técnico).
26. CARVALHO J.H.; GIRÃO R. N. Conservação de recursos genéticos animais: a situação do bovino Pé-duro ou Curraleiro. In: Simpósio de recursos genéticos para a América latina e caribe. SIRGEAL, 2., BRASÍLIA. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e biotecnologia, 1999. CD-Rom
27. CHEMICON INTERNATIONAL – A DIVISION OF SEROLOGICALS CORPORATION, **Introduction to antibodies** – Estados Unidos – 2ª ed [on line], 2006. Disponível em: <http://www.chemicon.com>. Acesso em: 28/09/2006
28. COLE, D. J., ROUSSEL, A. J., WHITNEY, M. S. Interpreting a bovine CBC: Evaluating the leukon and acute-phase proteins. **Veterinary Medicine**, Londres, v.92, n.5, p.470-478, 1997.
29. COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology**. 3ed., Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986. 566 p.
30. COSTA, J. N. **Leucograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linneus, 1758) sadios da raça Nelore criados no Estado de São Paulo. Influência dos fatores etários e sexuais**. 1994. 124f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

31. COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R.; Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 399-403. 2000.
32. CUENCA, E. M.; YERO, O. M.; FREEMAN, P.; PORRAS, O. M.; ROSSEAU, J. D.; SÁNCHEZ, W. R.; TAMAYO, W. S. Reacción leucocitaria ante el estrés nutricional provocado por la sequía en bovino. **Revista electrónica de Veterinaria**, Cuba, v.VIII, n.7, p.1695-7504, 2007.
33. DAVIS, W. C.; MACHUGH, N. D.; PARK, Y. H.; HAMILTON, M. J.; WYATT, C. R. Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3 (BoCD3). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.39, n.1-3, p.85-91, 1993.
34. DAVIS, W. C.; NAESSENS, J.; BROWN, W. C.; ELLIS, J. A.; HAMILTON, M. J.; CANTOR, G. H.; BARBOSA, I. R.; FERENS, W.; BOHACH, G. A. Analysis of monoclonal antibodies reactive with molecules upregulated or expressed only on activated lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.52, n.4, p.301-311, 1996.
35. DRAKE, L.; McGOVERN-BRINDISI, E. M.; DRAKE, J. R. BCR ubiquitination controls BCR-mediated antigen processing and presentation. **Blood**, New York, v.108, n.13, p.4086-4093, 2006
36. FAGLIARI, J. J., SANTANA, A. E., LUCAS, F. A., CAMPUS FILHO, E., CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos lactentes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.263-271, 1998.

37. FEITO, M. J.; JIMÉNEZ-PERIAÑEZ, A.; OJEDA, G.; SÁNCHEZ, A.; PORTOLÉS, P.; ROJO, J. M. The TCR/CD3 complex: molecular interactions in a changing structure. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Lekarsskich, v.50, p. 263-272, 2002.
38. FERENS, W. A.; DAVIS, W. C.; HAMILTON, M. J.; PARK, Y. H.; DEOBALD, C. F.; FOX, L.; BOHACH, G. Activation of Bovine Lymphocyte Subpopulations by Staphylococcal Enterotoxin C. **Infection and immunity**, Bethesda, v.66, n.2, p. 573–580, 1998.
39. FURTADO, V. M. G. **Imunofenotipagem em Leishmaniose cutânea – imunohistoquímica como ferramenta para estudar a reação imune e a apoptose em uma série de pacientes com Leishmaniose cutânea no Distrito Federal**. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Brasília, UnB.
40. GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1994. 169 p
41. GIBSON, J. P. Role of genetically determined resistance of livestock to disease in the developing world: Potential impacts and researchable issues. In: PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F.; McDERMOTT, K.R.; SONES, K. R.; THORNTON, P. K. **Investing in animal health research to alleviate poverty**. International Livestock Research Institute, Nairobi, cap 13, p. 1-14. 2002.
42. GIBSON, J. P.; BISHOP, S. C. Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: a global approach. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, Paris, v. 24, n. 1, p. 343-353, 2005
43. GIMENO, E.J. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA

- VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. **Anais...**, Belo Horizonte, 1995. p.17-51.
44. GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CANALS-CABALLERO, A.; ALMERIA, S.; PASQUALI, P.; ZARLENGA, D. S.; GASBARRE, L. C. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.120, n.3, p.199–214, 2004.
45. GONÇALVES, R. C.; PAES, P. R. O.; ALMEIDA, C. T.; FONTEQUE, J. H.; LOPES, R. S.; KUCHEMUCK, M. R. G.; CROCCI, A. J. Influência da idade e sexo sobre o hemograma, proteínas séricas totais, albumina e globulina de bovinos sadios da raça Guzerá (*Bos indicus*). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, n.1, p.61-68, 2001.
46. HAIDER, M. J.; SIDDIQUI, H. R. Haematology of cattle during summer and winter. **Chemosphere**, New York, v. 19, s/n, p. 12, 1989.
47. HARBO, S. J.; BARRINGTON, G. M.; ALLEN, A. J.; SAMPLE, G. L.; PARISH, S. M.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C. Characterization of lymphocyte populations by flow cytometry in a calf with sporadic juvenile lymphoma. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.33, n.3, p.163-167, 2004.
48. HILL, J. R.; SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of reproduction**, New York, v.67, n.1, p.55–63, 2002.
49. HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Washington, v.29, n.4, p.577-580, 1981.

50. JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. 989p
51. JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, P. T. M.; SHLOMCHIK, M. S. **Imunologia – o sistema imune na saúde e na doença**. 6.ed. Porto Alegre: Atmed, 2007. 824p.
52. JENSEN, A. L., HOVE, H.; NIELSEN, C. G. Critical difference of some bovine haematological parameters. **Acta Veterinária, Scandinavian**, v. 33, n. 3, p. 211-217, 1992.
53. JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e imunológicos de bovinos da raça curraleiro**. 2006. 107f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Universidade Federal de Goiás, UFG.
54. KAMPEN, A. H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T.; STORSET, A. K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.113, n.1-2, p.53–63, 2006.
55. KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI JR, M. E.; HARP, J. A. Phenotype Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Periparturient Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.82, n.2, p.315–319, 1999.
56. KNOWLES, T. G.; EDWARDS, J. E.; BAZELEY, K. J.; BROWN, S. N.; BUTTERWORTH, A.; WARRISS, P. D. Changes in the blood biochemical and hematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, London, v.174, n.21, p.593-598, 2000.
57. KOO, H. G.; PARK, Y. H.; HAMILTON, M. J.; BARRINGTON, G. M.; DAVIES, C. J.; KIM, J. B.; DAHL, J. L.; WATERS, W. R.; DAVIS, W. C. Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Experimentally Infected Calves. **Infection and immunity**, Bethesda, v.72, n.12, p. 6870–6883, 2004.

58. KRUGER, E. F.; BOYD, B. L.; PINCHUK, L. M. Bovine monocytes induce immunoglobulin production in peripheral blood B lymphocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v.27, n.10, p.889–897, 2003.
59. KUHNS, M. S.; DAVIS, M. M.; GARCIA, K. C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. **Immunity**, Cambridge, v.24, n. 2, p.133–139, 2006.
60. KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A.K. Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v.28, n.9, p.941–948, 2004
61. LE DEIST, F.; SAINT BASILE, G.; RIEUX-LAUCAT, F.; HIVROZ, C.; FISCHER, A. Anomalies d'expression du complexe récepteur T de l'antigène/CD3 et déficits immunitaires. **Médecine Sciences**, Québec, v.23, n.2, 2007.
62. MARIANTE, A. S., DE BEM, A. R. Animal genetic resources conservation programme in Brasil. **Animal Genetic Resource Information**, Roma, n.10, p. 9-32, 1992.
63. MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: Raças domésticas da história do Brasil**. Brasília, Embrapa Sede, 2000, 227p.
64. MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection, **Theriogenology**, Oxford, n.57, p. 223-235, 2002.
65. MEGLIA, G. E.; JOHANNISSON, A.; AGENÄS, S.; HOLTENIUS, K.; WALLER, K. P. Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and

- health in periparturient dairy cows. **The Veterinary Journal**, Londres, v.169, n.3, p.376–384, 2005.
66. MENGE, C.; NEUFELD, B.; HIRT, W.; BAUERFEIND, R.; BALJER, G.; WIELER, L. H. Phenotypical characterization of peripheral blood leucocytes in the newborn calf. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, Berlim, v.46, n.8, p.559-565, 1999.
67. MILNES, A. S.; BAILEY, M.; KNOWLES, T. G.; COLES, G. C.; Green, L. E.; DAY, M. J. An Immunohistochemical assessment of the cutaneous immune response to louse infestation in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.136, n.4, p.240-249, 2007.
68. MIRSKY, M. L.; OLMSTEAD, C. A.; DA, Y.; LEWIN, H. A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **Journal of virology**, Baltimore, v.70, n.4, p.2178–2183, 1996.
69. MIYAZAWA, K.; ASO, H.; HONDA, M.; KIDO, T.; MINASHIMA, T.; KANAYA, T.; WATANABE, K.; OHWADA, S.; ROSE, M. T.; YAMAGUCHI, T. Identification of bovine dendritic cell phenotype from bovine peripheral blood. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.81, n.1, p.40–45, 2006.
70. MONKE, D. R.; KOCIBA, G. J.; DEJARNETTE, R.; ANDERSON, D. E.; AYARS, W. H. Reference values for selected hematologic and biochemical variables in Holstein bulls of various ages. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.59, n.11, p.1386-1391, 1998.
71. MORRIS, D. D.; LARGE, S. M. Alterações no leucograma. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, v. 1, p. 437-456, 1993.

72. NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.966-973, 2005.
73. NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p 325-329, 2006.
74. NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. Revista. **Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.23, n.2, p.15-23, 2001.
75. NIKU, M.; PESSA-MORIKAWA, T.; RA, R.; EKMAN, A., IIVANAINEN, A. Expression of CD34 mRNA and protein in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.117, n.3-4, p.162–172, 2007.
76. OLIVEIRA, S. R. **Detecção de *Haemophilus parasuis* por meio da técnica de imunoperoxidase em suínos experimentalmente infectados**. 1998. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte.
77. OLIVEIRA, N. J. F.; MELO, M. M.; LAGO, L. A.; NASCIMENTO, E. F. Hemograma, bioquímica sérica e histologia da biópsia hepática de bovinos após administração de polpa cítrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.3, p.418-422, 2005.
78. PARK, Y. H.; FOX, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C. Bovine Mononuclear Leukocyte Subpopulations in Peripheral Blood and Mammary Gland Secretions During Lactation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.75, n.5, p.998-1006, 1992.
79. PAULA NETO, J. B. **Hemogramas de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro de diferentes idades, machos e fêmeas, gestantes e**

- não gestantes**. 2004. 65f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, UFG.
80. PEIXOTO, A.P.C.; COSTA, J. N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; SAITO, M.E. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v.3, n.1, p.16-20, 2002.
81. PESSA-MORIKAWA, T.; NIKU, M.; IIVANAINEN, A. Persistent differences in the level of chimerism in B versus T cells of freemartin cattle. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v.28, n.1, p.77–87, 2004.
82. PINCHUK, L. M.; BOYD, B. L.; KRUGER, E. F.; RODITI, I.; FURGER, A. Bovine dendritic cells generated from monocytes and bone marrow progenitors regulate immunoglobulin production in peripheral blood B cells. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v.26, n4, p.233–249, 2003.
83. PRIMO, A T. El ganado bovino ibérico em las américas 500 años despues . **Archivos de Zootecnia**, EMBRAPA/CPATB, Pelotas, p. 183-199, 1992.
84. RAJ, G. D.; MATHIVANAN, B.; MATHESWARAN, K.; NACHIMUTHU, K.; DAVIS, W. C. Lymphocyte subset distribution in apparently normal and single intradermal test-positive water buffaloes analyzed by flow cytometry. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.82, n.1, p.34–38, 2007.
85. RAMOS-VARA, J. A. Review Article – Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, New York, v. 42, p.405-426, 2005.

86. ROITT, I. **Imunologia**. 7.ed. São Paulo: Editora Manole, 2003, 481p.
87. ROSENBERGER, R. F. **Exame clínico dos bovinos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.
88. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007, 221p.
89. SHAN-RONG, S.; COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval techniques: current perspectives. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Washington, v.49, n.8, p.931-937, 2001
90. STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2001, 408p.
91. SUETAKE, H.; RATAN SAHA, N.; ARAKI, K.; AKATSU, K.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Lymphocyte surface marker genes in fugu. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Londres, Part D, v.1, n.1, p.102 – 108, 2006.
92. TEIXEIRO, E.; DANIELS, M. A.; HAUSMANN, B.; SCHRUM, A. G.; NAEHER, D.; LUESCHER, I.; THOME, M.; BRAGADO, R.; PALMER, E. T cell division and death are segregated by mutation of TCR β chain constant domains. **Immunity**, Cambridge, v.21, n.4, p.515–526, 2004.
93. THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Editora Roca. 2007, 582p.
94. TIZARD, I. **Imunologia veterinária – uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Editora Roca. 2002, 532p.

95. VELLOSO, L. Evolução e tendências da pecuária bovina de corte no Brasil, Produção de novilho de corte In: SIMPOSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., 1996, Piracicaba, **Anais...**, Piracicaba, FEALQ, 1996. p. 1-40.
96. VESOSKY, B.; TURNER, O.C.; TURNER, J.; ORME, I.M. Activation marker expression on bovine peripheral blood gd T cells during post-natal development and following vaccination with a commercial polyvalent viral vaccine. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v.27, n.5, p.439–447, 2003.
97. VIANA, U. Sobre o gado Curraleiro, notas históricas e apontamentos sobre os bovinos no Brasil. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, 41p, 1927.
98. WIKSTRÖM, I. **Molecular genetics of B- and T-lymphocyte development**. 2006. 72f. Tese (Doutorado em Genética Médica) - Umea University, USA.
99. WILSON, R. A.; ZOLNAI, A.; RUDAS, P.; FRENYO, L. V. T-Cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.53, n.1, p.49-60, 1996.
100. WYATT, C. R.; MADRUGA, C.; CLUFF, C.; PARISH, S.; HAMILTON, M. J.; GOFF, W.; DAVIS, W. C. Differential distribution of $\gamma\delta$ T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. **Veterinary Immunology and Immunopatology**, Amsterdam, v.40, n.3, p.187-199, 1994.
101. YASUDA, M.; TAKANASHI, M.; NASU, T.; MURAKAMI, T. Histological studies on the ontogeny of bovine palatine and pharyngeal tonsil: Germinal center formation, IgG, and IgA mRNA expression. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v.29, n.5-6, p.279–293, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1:

Solução Citrato:

- Dissolver 2,1g ácido cítrico em 1L de água destilada.
- Acertar o pH para 6,0 com NaOH 5N

ANEXO 2:

EDTA:

- Dissolver 0,372g de ácido etilenodiaminotetracético – EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2H_2O$) em 1L de água destilada.
- Acertar o pH para 8,0 com NaOH 5N

ANEXO 3:

Soro Albumina Bovina (BSA 3%) - (estocar em congelador):

- Dissolver 3g de BSA em 100mL de PBS 1%
 - PBS 1% (salina-fosfato tamponada):
Dissolver 100mL de PBS 10% em 900mL de água destilada.
 - PBS 10%:
 - Dissolver 14g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) + 4,3g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) + 7,2 g de cloreto de sódio (NaCl) em 1 L de água destilada.
 - Acertar o pH para 7,2

ANEXO 4:

Leite desnatado:

- Dissolver 10g leite desnatado em pó em 250ml de água destilada.

ANEXO 5:

Silanização das lâminas:

- Realizar limpeza das lâminas com álcool
- Manipular as lâminas limpas com luvas
- Preparar três cubas contendo:
 - 1) 250 mL de acetona PA
 - 2) Solução de silano: 250 mL de acetona PA + 10 mL de solução de organosilano a 4% (3, *aminopropyl-triethoxysilane*, Sigma – USA)
 - 3) 250 mL de acetona PA
- Imersão das lâminas em acetona (1^a cuba) por dois minutos, esgotar bem o excesso;
- Imersão das lâminas em silano a 4% (2^a cuba) por dois minutos, esgotar bem o excesso;
- Imersão em acetona (3^a cuba) por quatro vezes, esgotar bem o excesso;
- Secagem em estufa, deixar esfriar e guardá-las em caixa.

ANEXO 6:

Solução de TRIS:

- Dissolver 6g Trizima base ($C_4H_{11}NO_3$) + 8,5g cloreto de sódio (NaCl) em 1L de água destilada
- Acertar o pH para 7,4 com HCL 50%

ANEXO 7:

TABELA 9 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 1 (G1) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
02	7600	72	5472	63	3447,36	26	1422,72
05	8300	69	5727	61	3493,47	30	1718,1
07	7900	59	4661	64	2983,04	32	1491,52
09	7700	69	5313	73	3878,49	35	1859,55
11	10100	54	5454	54	2945,16	21	1145,34
12	7400	58	4292	61	2618,12	22	944,24
35	9300	55	5115	63	3222,45	34	1739,1
37	12600	73	9198	71	6530,58	29	2667,42
38	10200	70	7140	61	4355,4	36	2570,4
39	8100	72	5832	54	3149,28	19	1108,08
Média	8920	65	5820	63	3662	28	1667
s	1645	8	1408	6	1123	6	583
cv	18	12	24	10	31	22	35
Mediana	8200	69	5463	62	3335	30	1605
moda	-	72	-	61	-	-	-

TABELA 10 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 2 (G2) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
15	7700	59	4543	57	2589,51	31	1408,33
16	13600	73	9928	58	5758,24	32	3176,96
19	10600	40	4240	81	3434,4	32	1356,8
22	6000	78	4680	62	2901,6	36	1684,8
23	5100	82	4182	74	3094,68	39	1630,98
24	7200	71	5112	64	3271,68	41	2095,92
25	10200	62	6324	56	3541,44	33	2086,92
26	11600	73	8468	66	5588,88	37	3133,16
27	8700	61	5307	62	3290,34	21	1114,47
28	6000	65	3900	63	2457	45	1755
30	8900	57	5073	51	2587,23	32	1623,36
31	7000	49	3430	67	2298,1	35	1200,5
32	8800	59	5192	64	3322,88	36	1869,12
34	7300	72	5256	68	3574,08	39	2049,84
41	8700	73	6351	63	4001,13	30	1905,3
Média	8493	65	5466	64	3447	35	1873
s	2289	11	1734	7	1019	6	603
cv	27	17	32	11	30	16	32
Mediana	8700	65	5112	63	3290,34	35	1755
moda	6000	73	-	62	-	32	-

TABELA 11 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 3 (G3) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
137	10700	43	4601	59	2714,59	36	1656,36
122	10300	72	7416	66	4894,56	35	2595,6
45	16100	70	11270	70	7889	32	3606,4
57	9900	69	6831	68	4645,08	37	2527,47
107	7200	68	4896	67	3280,32	30	1468,8
61	7700	75	5775	63	3638,25	34	1963,5
104	12700	73	9271	70	6489,7	28	2595,88
63	8600	61	5246	69	3619,74	33	1731,18
67	11000	67	7370	63	4643,1	43	3169,1
68	12500	69	8625	68	5865	36	3105
109	11200	72	8064	55	4435,2	37	2983,68
103	14000	64	8960	74	6630,4	38	3404,8
71	9700	80	7760	57	4423,2	35	2716
73	11300	58	6554	72	4718,88	39	2556,06
91	8700	76	6612	67	4430,04	20	1322,4
92	11100	68	7548	71	5359,08	34	2566,32
93	9200	76	6992	70	4894,4	44	3076,48
114	9500	74	7030	70	4921	36	2530,8
115	14500	66	9570	78	7464,6	36	3445,2
119	9100	63	5733	60	3439,8	32	1834,56
120	10900	70	7630	70	5341	32	2441,6
124	9800	73	7154	71	5079,34	28	2003,12
Média	10714	69	7314	67	4946	34	2514
s	2195	8	1600	6	1308	5	659
cv	20	11	22	8	26	15	26
Mediana	10500	70	7262	69	4807	35	2561
moda	-	72	-	70	-	36	-

TABELA 12 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 4 (G4) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
58	11400	75	8550	63	5386,5	28	2394
59	11600	86	9976	72	7182,72	27	2693,52
60	12800	65	8320	75	6240	36	2988
62	10200	73	7446	60	4467,6	24	1787,04
106	8000	81	6480	57	3693,6	34	2203,2
64	13700	76	10412	65	6767,8	26	2707,12
65	12900	66	8514	59	5023,26	40	3405,6
66	12300	69	8487	70	5940,9	29	2461,23
69	10200	78	7956	54	4296,24	25	1989
70	11400	78	8892	70	6224,4	28	2489,76
72	14100	69	9729	63	6129,27	41	3988,89
74	9200	70	6440	75	4830	37	2382,8
75	18300	74	13542	64	8666,88	29	3927,18
76	16300	87	14181	50	7090,5	23	3261,63
77	18200	68	12376	62	7673,12	43	5321,68
78	16200	76	12312	72	8864,64	26	3201,12
Média	12925	74	9601	64	6155	31	2950
s	3062	7	2382	7	1512	7	897
cv	24	9	25	12	25	21	30
Mediana	12550	74,5	8721	64	6177	29	2700
moda	11400	76	-	63	-	28	-

TABELA 13 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 5 (G5) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
24	13300	46	6118	70	4282,6	26	1590,68
135	6200	70	4340	65	2821	22	954,8
46	12600	44	5544	59	3270,96	34	1884,96
53	16800	59	9912	57	5649,84	21	2081,52
94	16300	75	12225	59	7212,75	20	2445
96	6900	87	6003	72	4322,16	27	1620,81
97	7000	80	5600	58	3248	27	1512
98	10400	77	8008	64	5125,12	33	2642,64
108	11100	60	6660	58	3862,8	24	1598,4
Média	11178	66	7157	62	4422	26	1815
s	3961	15	2490	6	1387	5	515
cv	35	23	35	9	31	19	28
Mediana	11100	70	6118	59	4282,6	26	1620,81
moda	-	-	-	59	-	27	-

TABELA 14 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 6 (G6) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
02	10100	46	4646	62	2880,52	32	1486,72
03	8700	71	6177	67	4138,59	35	2161,95
06	7800	38	2964	58	1719,12	29	859,56
142	8200	84	6888	56	3857,28	22	1515,36
12	7000	50	3500	65	2275	29	1015
14	8600	71	6106	61	3724,66	16	976,96
121	7500	56	4200	70	2940	33	1386
111	11600	53	6148	62	3811,76	32	1967,36
16	12000	52	6240	66	4118,4	35	2184
20	8900	45	4005	70	2803,5	36	1441,8
143	18900	40	7560	68	5140,8	27	2041,2
25	9500	55	5225	66	3448,5	33	1724,25
32	11100	59	6549	58	3798,42	25	1637,25
138	6200	70	4340	61	2647,4	29	1258,6
139	7200	50	3600	73	2628	39	1404
34	8700	55	4785	58	2775,3	31	1483,35
36	11800	44	5192	67	3478,64	38	1972,96
38	9400	47	4418	60	2650,8	34	1502,12
192	6600	63	4158	57	2370,06	37	1538,46
39	5600	75	4200	61	2562	27	1134
42	9600	60	5760	64	3686,4	45	2592
44	14500	62	8990	65	5843,5	33	2966,7
50	14900	50	7450	72	5364	32	2384
110	7200	69	4968	68	3378,24	30	1490,4
136	15300	58	8874	52	4614,48	35	3105,9
95	6900	62	4278	65	2780,7	37	1582,86
Média	9762	57	5432	64	3440	32	1724
s	3240	11	1594	5	1006	6	575
cv	33	20	29	8	29	18	33
Mediana	8800	56	5080	65	3413	33	1527
moda	8700	50	4200	58	-	32	-

TABELA 15 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 7 (G7) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
01	8400	47	3948	74	2921,52	24	947,52
117	16300	42	6846	69	4723,74	32	2190,72
09	10600	53	5618	69	3876,42	33	1853,94
17	11300	54	6102	72	4393,44	32	1952,64
18	9300	60	5580	69	3850,2	29	1618,2
19	9000	81	7290	71	5175,9	43	3134,7
48	8200	60	4920	71	3493,2	32	1574,4
113	10400	65	6760	54	3650,4	40	2704
130	5800	62	3596	53	1905,88	28	1006,88
55	9900	59	5841	72	4205,52	51	2978,91
82	13200	54	7128	50	3564	37	2637,36
84	7600	48	3648	63	2298,24	31	1130,88
87	12200	59	7198	57	4102,86	28	2015,44
99	8100	60	4860	56	2721,6	32	1555,2
Média	10021	57	5667	64	3634	34	1950
s	2650	9	1314	8	917	7	710
cv	26	16	23	13	25	21	36
Mediana	9600	59	5730	69	3750	32	1903
moda	-	60	-	69	-	32	-

TABELA 16 - Valores médios, desvio-padrão (s), coeficiente de variação (cv), mediana e moda das variáveis do grupo 8 (G8) de bovinos sadios da raça Curraleiro – Goiânia, 2008.

animal	WBC	Diferencial Linfócitos	Linfócito Absoluto	LT Relativo	LT Absoluto	LB Relativo	LB Absoluto
5317	8500	55	4675	66	3085,5	30	1402,5
745550	14500	78	11310	73	10585	20	2262
47	13300	65	8645	59	5100,55	51	4408,95
105	11200	51	5712	59	3370,08	21	1199,52
Média	11875	62	7586	64	5535	31	2318
s	2631	12	2999	7	3482	14	1468
cv	22	19	40	10	63	47	63
Mediana	12250	60	7179	63	4235	26	1832
moda	-	-	-	59	-	-	-