

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IMUNOFENOTIPAGEM DE SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS-T NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE
EQÜINOS.**

Roberta Ferro de Godoy
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Junho de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNOFENOTIPAGEM DE SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS-T NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE
EQÜINOS.**

Roberta Ferro de Godoy

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2006

Godoy, Roberta Ferro de
G589i Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos-T no sangue do
cordão umbilical de eqüinos./Roberta Ferro de Godoy. --
Jaboticabal, 2006
vii, 52: il.; 26 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Maria Angélica Dias, Ana Paula Massae
Nakage Canesin, Márcia Rita Fernandes Machado, Júlio Carlos
Canola
Bibliografia

1. Sangue do cordão umbilical. 2. Imunofenotipagem. 3. Eqüinos
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.15:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Roberta Ferro de Godoy - nascida em 10 de julho de 1977 em São Paulo – SP. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal em dezembro de 1999. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária (Residência) na Área de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais, junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – Unesp – Câmpus de Jaboticabal de fevereiro de 2000 a janeiro de 2002, sob orientação do Prof. Dr. José Wanderley Cattelan. Obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária em julho de 2003, sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana. Ingressou no doutorado em Cirurgia Veterinária em agosto de 2003.

***“Des hommes et des chevaux,
ensemble, allons toujours plus loin...”***

*“Neste momento, volto meu pensamento à infância,
passo pela minha mocidade e chego até hoje.
Em todos os momentos, encontro Aquele
que sempre esteve ao meu lado,
no silêncio do meu quarto, no crepúsculo
e no nascer de uma nova manhã:
o Senhor meu Deus!
É Tua a minha vida, a alegria de hoje e todas
as incertezas do amanhã.”*

*“A mesma vida da qual originalmente nos
é legada uma fração, um certo dia se esvai,
foge do nosso convívio, por um processo do qual
a ciência não conhece sequer os rudimentos.
De sua existência resta comigo o exemplo, a saudade
imensa, o eterno agradecimento, além do pesar de
não poder abraçá-la agora e partilharmos
juntas da alegria da tarefa cumprida.”*

*À minha mãe **Maria Teodora Ferro** (in memoriam), que
se faz presente em todos os dias da minha vida,
sei que de seu lugar olha por mim,
sofre com minhas derrotas e
rejubila comigo em minhas vitórias...*

...DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Roberto, às minhas avós Waldeti e Helena, às minhas irmãs Daniela e Renata, ao meu sobrinho João Pedro e todos tios e primos, pelo imenso amor e extraordinário exemplo de dedicação e esperança. Pelos fortes laços e torcida por esta importante vitória

Ao meu namorado e grande companheiro Nilson, pelo amor dedicado, pelo companheirismo demonstrado na realização deste trabalho e em todos os outros momentos da nossa vida.

Ao meu avô Esmeraldo (*in memorian*), por ter me ensinado o valor de se fazer as coisas da melhor maneira possível e por me olhar de seu lugar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana pela grande amizade, paciência, sabedoria e por acreditar em mim, possibilitando concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), por ter me concedido uma bolsa de estudos e auxílio pesquisa para que fosse possível a concretização deste projeto.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp-Câmpus de Jaboticabal, pela amizade, convivência harmoniosa e pela colaboração valiosa nos procedimentos analítico-laboratoriais.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp-Câmpus de Jaboticabal por ter me concedido a chance de realizar o doutorado.

A todos os docentes da FCAV/Unesp por não serem apenas mestres, mas amigos que me guiam pelo exemplo de amor à profissão de educadores.

Aos Professores Wilter Ricardo Russiano Vicente, Gilson Hélio Toniollo, Márcia Rita Fernandes Machado, Júlio Carlos Canola, Maria Angélica Dias e Ana Paula massae Nakage Canesin pelas contribuições imprescindíveis que me passaram na qualificação e na defesa da tese.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

Ao Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico da Alta Mogiana-APTA-Colina (SP) e ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro – FMRP/USP-Ribeirão Preto (SP) por me acolher e possibilitar a realização do presente trabalho.

A todos amigos, especialmente Denise, Fernanda, Letícia, Ana Paula, Gregório, Nádia, Patrícia, Fabiano, Lílian, Zé Antônio, Sílvio, Inês, Lisiane e Paula pela força, atenção, companheirismo e amizade durante a minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS.....	03
2.1.1 Papel dos linfócitos na resposta imune	03
2.1.2 Moléculas de superfície das células linfocitárias	04
2.2 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL	05
2.2.1 Linfócitos T no SCU.....	05
2.2.2 Colheita e avaliação do sangue do cordão umbilical humano.....	05
2.2.3 Colheita e avaliação do sangue do cordão umbilical eqüino	07
2.3 MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS EM EQÜINOS.....	07
2.3.1 Técnica citofluorométrica.....	08
2.3.2 Preparo das amostras	10
2.3.3 Imunofenotipagem de linfócitos	10
2.3.4 Imunofenotipagem dos linfócitos em eqüinos.....	11
2.4 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DO CORDÃO UMBILICAL E DOS ANEXOS FETAIS DE EQÜINOS	13
2.5 VALORES ERITROLEUCOMÉTRICOS DE REFERÊNCIA EM POTROS AO NASCIMENTO	15
2.5.1 Valores eritrométricos de referência em potros ao nascimento.....	15
2.5.2 Valores leucométricos de referência em potros ao nascimento	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS	20

3.2 PARCELAS EXPERIMENTAIS	20
3.3 COLHEITA DO SANGUE	21
3.4 PROCESSAMENTO DO SANGUE	22
3.4.1 Avaliação hematológica.....	22
3.4.2 Avaliação citofluorométrica.....	22
3.5 CÁLCULO DA QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS	25
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 ERITROGRAMA.....	26
4.2 LEUCOGRAMA.....	29
4.3 IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS	32
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE.....	51
Eritroleucograma de referência para eqüinos adultos sadios.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CD	“Cluster designation”
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético
FACS.....	“Fluorescence Activated Cell Sorter”
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	“Forward Scatter”
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HT	Hematócrito
NB	Neutrófilo bastonete
NK	“Natural killer”
NS	Neutrófilo segmentado
PE	Ficoeritrina
SCU.....	Sangue do cordão umbilical
SSC.....	“Side Scatter”
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.....	27
Tabela 2. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.....	30
Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens de células CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e razão CD4 ⁺ :CD8 ⁺ , obtidos por meio da citometria de fluxo do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006....	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da análise por citometria de fluxo no separador de células ativado pela fluorescência (FACS), mostrando a câmara de fluxo e os dispersores de luz, que separam as células por tamanho e granularidade.	09
Figura 2. Representação esquemática da circulação fetal, evidenciando os vasos do cordão umbilical (duas artérias e uma veia) e o ducto alantóide.....	14
Figura 3. Ilustração da representação gráfica da leitura das células sanguíneas por tamanho e complexidade interna, controle negativo e distribuição de subpopulações linfocitárias CD4 ⁺ RPE e CD8 ⁺ RPE, no sangue do cordão umbilical eqüino, após leitura citofluorométrica.....	24
Figura 4. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.	28
Figura 5. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.....	31
Figura 6. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens de células CD5 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , obtidas por meio da citometria de fluxo do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.....	34

IMUNOFENOTIPAGEM DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS-T NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE EQÜINOS.

RESUMO – Apesar da importância do sangue do cordão umbilical (SCU) como fonte de células tronco e do advento da imunofenotipagem de linfócitos, não existem estudos sobre a imunofenotipagem de linfócitos do sangue do cordão umbilical eqüino. Este estudo visou determinar os valores eritroleucométricos e quantificar as subpopulações de linfócitos-T no SCU e no sangue obtido por venipunção da jugular de eqüinos neonatos da raça Brasileiro de Hipismo. Para tanto, foram realizadas as colheitas de SCU e da jugular de 20 potros ao nascimento. As amostras foram submetidas às determinações dos valores eritroleucométricos e à quantificação de subpopulações de linfócitos-T, pela técnica citofluorométrica. Não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os valores médios obtidos para tais parâmetros quando comparados o sangue central e o SCU de neonatos eqüinos. Os valores eritrométricos encontrados no SCU e da jugular de neonatos equinos, exceto o VCM, se situaram na faixa de normalidade para animais adultos e foram inferiores aos valores reportados para eqüinos neonatos. O valor absoluto para neutrófilos segmentados, no SCU e no sangue da jugular dos neonatos, foi inferior ao reportado para eqüinos ao nascimento. As contagens de linfócitos CD5+ e CD4+ no SCU e jugular de neonatos eqüinos foram inferiores àquelas reportadas para o sangue periférico de eqüinos adultos, indicando um componente imunológico imaturo. No entanto, a contagem de linfócitos CD8+ foi semelhante à reportada para o sangue periférico de eqüinos adultos. A proporção CD4:CD8 obtida neste ensaio, tanto para o SCU ($2,64\pm0,91$) quanto para o sangue obtido por venipunção jugular ($2,41\pm0,81$), em eqüinos neonatos demonstrou dominância das células T CD4+ sobre os linfócitos T CD8+.

Palavras-Chave: eqüinos, imunofenotipagem, sangue do cordão umbilical, subpopulações linfocitárias.

IMMUNOPHENOTYPING OF T LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN EQUINE UMBILICAL CORD BLOOD.

SUMMARY – Although the importance of umbilical cord blood as source of stem cells and the advent of lymphocytes immunophenotyping, no studies have been performed on the immunophenotyping of equine UCB lymphocytes. The objective of the present work was to determine erythrometric and leukometric values and quantify subpopulations of lymphocytes in UCB and jugular blood of neonatal horses. UCB and jugular blood were collected from 20 foals of the Brazilian of Hipism breed at birth and processed for determination of erythrometric and leukometric values and quantification of subpopulations of T lymphocytes by cytofluorometry. No significant differences ($p<0.05$) were observed between average values in jugular blood of neonates and UCB of horses. Erythrometric values, except for mean corpuscular volume (MCV), were within the normal range seen in adult animals and below those reported for foal's circulating blood. Total values observed for segmented neutrophils in UCB and jugular blood of neonates were below those reported for horses at birth. CD5+ and CD4+ lymphocytes were in lower frequencies in UCB and jugular blood of neonates than in peripheral blood of adult horses, indicating an immature immunological component. The frequency of CD8+ lymphocytes, however, was similar to that described for the peripheral blood of adult horses. The CD4:CD8 proportion observed in the present study, for UCB (2.64 ± 0.91) as well as for neonatal jugular blood (2.41 ± 0.81), showed predominance of CD4+ T cells over CD8+ T lymphocytes.

Keywords: equines, immunophenotyping, umbilical cord blood, lymphocyte subpopulations.

1. INTRODUÇÃO

A importância do estudo do sangue do cordão umbilical (SCU), em seres humanos, foi verificada em trabalhos recentes que têm demonstrado a presença de células tronco (“stem-cells”) no sangue desta estrutura, representando uma fonte alternativa para reconstituição tecidual (GLUCKMAN et al., 1989; BROXMEYER et al., 1991; VILMER et al., 1992; WAGNER et al., 1992).

Dimitriou et al. (1998) relataram que, em seres humanos, o SCU é uma fonte rica em células tronco com elevada capacidade de proliferação e auto-renovação, onde o compartimento de linfócitos do SCU possui características imunofenotípicas associadas com imaturidade funcional.

A baixa incidência da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) em transplantes de SCU, em seres humanos, deve-se provavelmente à imaturidade das células T (GLUCKMAN et al., 1989; WAGNER, 1993; LU et al., 1996; LIN; CHAO, 2001).

Schumacher e Burkhead (2000) asseveraram que a distribuição das diferentes subpopulações linfocitárias e as características tintoriais dos linfócitos do SCU diferem daquelas do sangue periférico, em seres humanos. Ademais, que fenotipagem de linfócitos do SCU é, facilmente, realizada através da citometria de fluxo, técnica que quantifica células coradas com reagentes fluorescentes específicos.

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para os antígenos de diferenciação leucocitária tem facilitado a definição fenotípica e funcional do sistema imune de várias espécies. Em relação aos aspectos imuno-hematológicos dos eqüinos, os estudos de imunofenotipagem através de anticorpos anti-antígenos CD são muito escassos. A maioria dos anticorpos específicos para antígenos CD, desenvolvidos para algumas espécies, exibe reação cruzada mínima com outras espécies, restringindo sua ampla utilização (BLANCHARD-CHANNEL; MOORE; STOTT, 1994).

Apesar da importância do sangue do cordão umbilical como fonte de células tronco e do advento da imunofenotipagem de linfócitos, ainda não existem muitos estudos sobre as células sangüíneas do cordão umbilical em animais domésticos. Autores fazem referência à imunofenotipagem de linfócitos do sangue periférico de eqüinos adultos (LUNN; HOLMES; DUFFUS, 1991; BLANCHARD-CHANNEL; MOORE; STOTT, 1994; KYDD et al., 1994; AKENS et al., 1997; BENDALI-AHCÈNE et al., 1997), no entanto, as características imunofenotípicas das células linfocitárias do SCU desta espécie ainda não foram avaliadas.

Idealizou-se o presente ensaio com objetivo principal de imunomarcas as células linfocitárias pan-T e as subpopulações CD4 e CD8, com a utilização de marcadores de superfície (anticorpos monoclonais), no sangue do cordão umbilical em eqüinos neonatos sadios e obter informações sobre o desenvolvimento da capacidade imunológica dos eqüinos, particularmente, da imunocompetência do neonato.

Adicionalmente, comparou-se os dados obtidos no SCU eqüino com o sangue obtido na jugular dos referidos neonatos. Ainda determinou-se os valores hematológicos no SCU, bem como no sangue da jugular de eqüinos neonatos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS

2.1.1 Papel dos linfócitos na resposta imune

A resposta imunológica nos mamíferos apresenta dois componentes principais, a inata ou inespecífica e a adaptativa ou específica. A imunidade inata é a primeira linha de defesa a ser ativada; ela envolve uma resposta antígeno-inespecífica constituída principalmente pelas barreiras físicas e bioquímicas dos epitélios e das mucosas, pelas células fagocitárias, pelas células “natural killer” e pelos constituintes protéicos sangüíneos (TIZARD, 2002).

O sistema imunológico adaptativo ou específico é ativado se a primeira linha de defesa for ultrapassada e envolve a geração de uma resposta produzida por células linfocitárias. Esse sistema produz, portanto, uma reação antígeno-específica, capaz de reconhecer e montar uma resposta imunológica contra os antígenos proporcionando padrões de resposta celular, mediada por linfócitos T, ou resposta humoral, mediada por linfócitos B e responsável pela produção de anticorpos (TIZARD, 2002).

A imunidade humoral consiste na destruição de antígenos exógenos presentes nos fluidos extracelulares, por anticorpos produzidos pelos linfócitos B. Por sua vez, a imunidade celular representa a destruição dos antígenos endógenos que invadem e crescem no interior das células e cujos anticorpos não podem alcançá-los (TIZARD, 2002).

O “pool” linfocitário é dividido em linfócitos T e B. Os linfócitos-T são agrupados em duas principais subpopulações pela expressão dos antígenos CD4 e CD8, que têm um papel importante como moléculas de diferenciação. Estes antígenos de superfície dos linfócitos são melhores caracterizados por anticorpos monoclonais em humanos e

roedores de laboratório, mas seus homólogos também têm sido caracterizados em animais domésticos tais como caninos, eqüinos, bovinos e felinos (LUNN; HOLMES; DUFFUS, 1991). As populações e subpopulações de linfócitos podem ser definidas anatomicamente, por suas vias de desenvolvimento; histologicamente, pela distribuição dentro dos tecidos linfóides; funcionalmente, por seus papéis dentro da resposta imune; e, fenotipicamente, através da expressão de suas moléculas de superfície (DAY, 2000).

2.1.2 Moléculas de superfície das células linfocitárias

Os linfócitos possuem, em sua superfície, estruturas importantes denominadas receptores antigênicos (TIZARD, 2002). Os linfócitos T são definidos pela expressão do receptor de antígenos das células T (TCR), que confere uma especificidade antigênica única à célula (DAY, 2000). Existem dois tipos bem definidos de TCR: o heterodimérico com dois peptídeos ligados por pontes dissulfeto (α e β) e o outro, que consiste em polipeptídeos γ e δ . Ambos receptores estão associados a um conjunto de cinco polipeptídeos, o complexo CD3, que, associados, dão origem ao complexo receptor (TCR-CD3) da célula T. O complexo de proteínas CD3 age na transdução de sinais e é encontrado em todos os linfócitos T. Aproximadamente 90 a 95% dos linfócitos T expressam o TCR $\alpha\beta$, e os restantes 5 a 10% são linfócitos T $\gamma\delta$ (TIZARD, 2002; ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

As células T $\alpha\beta$ podem, ainda, ser subdivididas em duas subpopulações não sobrepostas, uma apresentando o marcador CD4, possuindo a função de auxiliar ou induzir a resposta imune; e outra apresentando o marcador CD8, atuando predominantemente de forma citotóxica (ROITT; BROSTOFF; MALE 2003). O CD4 é uma glicoproteína de cadeia única de 55kDa e o CD8 é um dímero de 68 kDa, sendo ambos da superfamília das imunoglobulinas (TIZARD, 2002).

2.2 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

2.2.1 Linfócitos T no SCU

Estudos têm evidenciado que as células imunes do SCU possuem características diferentes daquelas do sangue periférico de adultos. Os linfócitos T do SCU, aparentemente, são imaturos funcionalmente (GLUCKMAN et al., 1989; WAGNER, 1993; LU et al., 1996; LIN; CHAO, 2001).

As funções e a expressão dos antígenos e receptores de superfície das células T presentes no SCU se encontram reduzidas, quando comparadas àquelas de células T adultas (LU et al., 1996; HAGENDORENS et al., 2000). Embora a imaturidade das células T no SCU não esteja completamente esclarecida, é fato que 80 a 90% de tais células expressam o fenótipo CD45RA, que caracteriza linfócitos imaturos (LU et al., 1996; LIN; CHAO, 2001).

2.2.2 Colheita e avaliação do sangue do cordão umbilical humano

Vários métodos de colheita de sangue do cordão umbilical humano têm sido propostos para otimizar o volume (TURNER; LUZINS; HUTCHENSON, 1992). Romão, Zago e Sala (1999) relataram que a colheita de sangue do cordão umbilical foi feita por venipunção da veia umbilical placentária, logo após o clampeamento do cordão com a placenta “*in loco*” ou após a dequitação placentária, cujo sangue fluiu por gravidade para uma bolsa coletora contendo como anticoagulante o citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA), resultando num volume de $64,6 \pm 30,2$ mL. O volume de SCU colhido com a placenta *in loco* ou após a dequitação placentária não apresentou diferenças significativas. Entretanto, Surbek et al. (2000) afirmaram que o volume e o número de células nucleadas do SCU foram mais elevados na colheita antes da dequitação placentária.

Embora Wong et al. (2001) tenham asseverado que a colheita do SCU humano *in loco* deve ser o procedimento de eleição, esta técnica ainda não foi padronizada e varia nas instituições que a realizam.

Valores hematológicos (exceto o número de hemácias e a concentração de hemoglobina corpuscular média), subpopulações linfocitárias ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) e células progenitoras hematopoéticas no SCU humano apresentaram-se mais elevados do que aqueles obtidos no sangue periférico de adultos saudáveis quando avaliados por contadores automáticos de células, esfregaços corados com Metanol May-Grunwald Giemsa (MMG), citometria de fluxo e culturas celulares semi-sólidas (RUBINSTEIN et al., 1995; CHAISIRIPOOMKERE et al., 1999).

Motley et al. (1996) compararam os valores do SCU com aqueles do sangue periférico de seres humanos adultos usando a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Verificaram que no SCU existe menor porcentagem de células T ($CD3^+$) e células T citotóxicas ($CD8^+3^+$), e porcentagem significativamente maior de linfócitos B ($CD19^+3^-$), de células T auxiliares imaturas ($CD45RA^+4^+$), assim como maior relação $CD4/CD8$. Dimitriou et al. (1998) caracterizaram as células mononucleares e as subpopulações linfocitárias do SCU humano. Eles concluíram que, no SCU existe menor quantidade de células $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ em comparação com o sangue de adultos. Entretanto, a relação $CD4/CD8$ mostrou-se maior no SCU do que no sangue de seres humanos adultos.

Pranke et al. (2001) analisaram as moléculas de superfície dos linfócitos do SCU humano através da citometria de fluxo de duas cores. Os linfócitos T representaram 47% do total das células mononucleadas, sendo que os linfócitos T auxiliares ($CD3^+$ e $CD4^+$) e citotóxicos ($CD3^+$ e $CD8^+$) representaram 34% e 13% dos linfócitos, respectivamente.

Szabolcs et al. (2003) estabeleceram valores fisiológicos de subpopulações linfocitárias no SCU humano e os compararam com aqueles do sangue periférico de adultos. Encontraram um percentual maior de células imaturas, não apenas quanto às subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$, mas também quanto aos linfócitos B.

2.2.3 Colheita e avaliação do sangue do cordão umbilical eqüino

Godoy (2003) e Godoy et al. (2004) colheram o sangue do cordão umbilical e da veia jugular de potros ao nascimento e acondicionaram as amostras em tubos com e sem o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA a 10%). Os referidos autores determinaram as contagens globais de hemácias e de leucócitos, a concentração de hemoglobina, o volume globular, o volume corpuscular médio (VCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a fórmula leucocitária. Realizaram ainda a eletroforese protéica em gel de agarose, obtendo-se assim as diferentes frações protéicas do soro.

Os valores obtidos para tais variáveis no SCU de potros neonatos não apresentaram diferenças significativas em relação àqueles obtidos a partir da venipunção jugular dos mesmos animais, no momento do nascimento. Porém, quando comparado ao sangue de eqüinos adultos, o SCU apresentou valores significativamente maiores para contagem de hemácias, hemoglobina e CHCM e menores para VCM, proteína total, α , β e γ -globulinas, contagens global e diferencial de leucócitos, exceto contagem de neutrófilos bastonetes e monócitos (GODOY, 2003).

2.3 MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS EM EQÜINOS

Os linfócitos expressam em sua superfície uma série de moléculas de diferenciação, que pode ser usada para distinguir diferentes estádios evolutivos e diferentes subpopulações linfocitárias. Muitas moléculas podem ser identificadas com o uso de anticorpos monoclonais específicos. Recentemente, uma nomenclatura sistematizada foi instituída para as moléculas de superfície – o sistema CD, no qual os marcadores são numerados (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

O termo CD (*Cluster Designation* = denominação de grupamento) é derivado da análise, por computador, dos anticorpos monoclonais produzidos em diferentes laboratórios do globo terrestre, contra antígenos leucocitários humanos (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

O estudo dos aspectos morfológicos e o emprego de técnicas citoquímicas são meios clássicos para caracterização e classificação das células sangüíneas (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Porém, o emprego de técnicas imunocitoquímicas e a utilização da técnica de imunomarcagem com auxílio de anticorpos monoclonais têm promovido um avanço na definição e classificação das supracitadas células (GRINDEM, 1996).

Os anticorpos monoclonais podem marcar determinadas moléculas presentes na superfície membranária de linfócitos e demais leucócitos, que aparecem em estágios particulares de diferenciação celular ou quando tais células são ativadas por curto período. Em alguns casos, os antígenos ou moléculas membranárias são característicos de linhagens celulares distintas entre si (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Os anticorpos monoclonais conjugados com compostos fluorescentes, tais como Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) e Ficoeritrina (PE), podem ser incubados com as células a serem analisadas, permitindo a identificação e quantificação destas células pela citometria de fluxo (GRINDEM, 1996).

2.3.1 Técnica citofluorométrica

O citômetro de fluxo é um separador de células ativado por fluorescência (FACS= "Fluorescence Activated Cell Sorter"), que mede a intensidade de fluorescência de cada célula. As células são separadas de acordo com a sua fluorescência característica (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

As células, em suspensão, são marcadas com anticorpos específicos, conjugados com fluorocromos para detecção de moléculas de superfície e são introduzidas em uma câmara de fluxo. O fluxo de células que atravessa a câmara está suspenso em uma solução tampão, sendo que 500 a 4000 células ou partículas passam em fila única, por segundo, através do sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por laser argônio, que tem uma energia de luz incidente de 488 nm. Cada célula é

avaliada com relação ao tamanho (feixe de luz frontal) e granularidade e complexidade interna (feixe de luz lateral), bem como para a intensidade de fluorescência para detecção de diferentes marcadores de superfície (imunofenotipagem). A técnica de citometria de fluxo permite, portanto, identificar e quantificar células em suspensão com base no tamanho ("Forward scatter" -FSC), na granularidade ("Side scatter" -SSC) e na intensidade da fluorescência dessas células (Figura 1) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

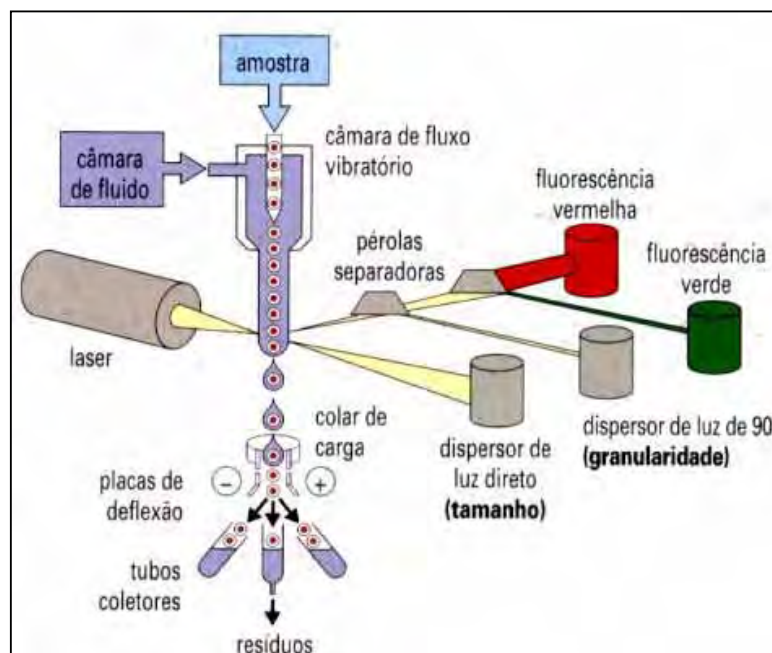


Figura 1. Representação esquemática da análise por citometria de fluxo no separador de células ativado pela fluorescência (FACS), mostrando a câmara de fluxo e os dispersores de luz, que separam as células por tamanho e granularidade (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

2.3.2 Preparo das amostras

Para a preservação das subpopulações linfocitárias T CD4 e CD8 o método recomendado para o preparo das amostras é a utilização da lise do sangue total, pois os métodos de separação de células linfocitárias por gradiente de densidade pelo Ficoll ou Histopaque requerem maior volume de sangue (PAXTON et al., 1989; RIDINGS et al., 1996).

Byrne et al. (2000) observaram que o isolamento de leucócitos do sangue periférico através do método da lise do sangue total produziu debris que dificultam a padronização. Já Faldyna et al. (2001), afirmaram que a lise do sangue total deve ser o método de escolha, principalmente nos casos em que há limitação quanto à quantidade de sangue colhida.

Nas colheitas de amostras de sangue para a citometria de fluxo, o anticoagulante recomendado é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que apresenta vantagens sobre os demais, pois proporciona uma boa separação das distintas populações leucocitárias e permite que as amostras possam ser analisadas satisfatoriamente em até 24 horas (PAXTON et al., 1989).

2.3.3 Imunofenotipagem de linfócitos

A fenotipagem de linfócitos, obtida por intermédio da citometria de fluxo, tem sido empregada no estudo de subpopulações linfocitárias na vigência de alguns estados patológicos e/ou nas alterações do sistema imune. Na medicina veterinária essa técnica tem sido utilizada para avaliar a progressão das infecções pelos vírus da Imunodeficiência Felina e da Leucemia Felina, na resposta de transplantes de órgãos, em modelos caninos, bem como na resposta imune a infecções (BYRNE et al., 2000). Anticorpos monoclonais que reconhecem linfócitos têm sido úteis no diagnóstico e avaliação da imunodeficiência, na terapia imunossupressora em transplantes de órgãos e doenças imunes, e na quimioterapia de leucemias e linfomas (RIVAS et al., 1996).

A citometria de fluxo permite a separação e contagem de células linfocitárias com base no tamanho das referidas células, bem como na intensidade de fluorescência destas células (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha para a citometria de fluxo devido a sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). Anticorpos monoclonais não são totalmente sensíveis ou específicos, portanto é recomendado o uso de dois ou mais marcadores para determinação de linhagem celular (CAREY; HANSON, 1994).

A análise dos linfócitos pela citometria de fluxo deve ser precedida pelas contagens total e diferencial dos leucócitos. Os valores absolutos para subpopulações linfocitárias são obtidos com base nas porcentagens da citometria, nos valores totais dos leucócitos e relativos dos linfócitos (BYRNE et al., 2000).

2.3.4 Imunofenotipagem dos linfócitos em eqüinos

Os linfócitos de eqüinos podem ser tipificados com anticorpos monoclonais conjugados com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) ou Ficoeritrina (PE). Os anticorpos monoclonais CVS5, CVS4 e CVS8 reagem, respectivamente, com as glicoproteínas CD5, CD4 e CD8 presentes na superfície dos linfócitos T, linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos/supressores (AKENS et al., 1997).

Os anticorpos monoclonais contra os antígenos eqüinos CD3, CD4, CD5, CD8, complexo maior de histocompatibilidade classe I (MHC I), complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC II) e linfócitos B foram padronizados por Lunn, Holmes e Duffus (1991), Blanchard-Channel, Moore e Stott (1994) e Kydd et al. (1994).

Lunn, Holmes e Duffus (1991), utilizando a citometria de fluxo de duas cores descreveram os anticorpos monoclonais CVS5, CVS4 e CVS8 específicos para os homólogos eqüinos CD5, CD4 e CD8. Embora a expressão de CD5 se aproxime de um marcador geral de linfócitos-T, um número variável de linfócitos-B também podem expressar este antígeno. Blanchard-Channel, Moore e Stott (1994) avaliaram dois anticorpos para linfócitos-T, o anti-CD3 (UC F6G-3) e o anti-CD5 (UC F13C-5)

sugerindo que ambos reconhecem a quase totalidade da população de linfócitos-T, encontrando poucos linfócitos-B CD5+, sendo, portanto, possível o uso desses marcadores para reconhecimento da população global de linfócitos-T.

A análise do sangue total de eqüinos adultos, por meio da citometria de fluxo, permite quantificar os linfócitos T e B, bem como as subpopulações linfocitárias. Bendali-Ahcène et al. (1997) reportaram que dentre as células leucocitárias, $32 \pm 3.2\%$ são representadas por linfócitos, dos quais obtiveram $30,2 \pm 14\%$ de linfócitos-B e $74,9 \pm 8\%$ de linfócitos CD5+, sendo $11,5 \pm 1\%$ de linfócitos CD8+ e $55,4 \pm 2\%$ de linfócitos CD4+. A somatória de linfócitos CD4+ e CD8+, que representaria a totalidade dos linfócitos CD5+, mostrou-se levemente inferior à quantidade de linfócitos CD5+, haja vista o fato que há uma pequena porcentagem de linfócitos-B que expressa o antígeno CD5. Assim, a quantidade de linfócitos-B que expressam o antígeno CD5 pode ser estimada subtraindo-se, do número de linfócitos CD5+, a somatória dos linfócitos CD4+ e CD8+. Nos resultados relatados pelos autores retromencionados, a porcentagem de linfócitos-B, que expressa o antígeno CD5, foi estimada em 8-10%.

Existem também as chamadas “células nulas”, ou seja, linfócitos que não expressam antígenos CD4, CD8 e nem tampouco imunoglobulinas de superfície. Esta população inclui as células natural killer (NK) e é estimada em $2,9 \pm 2,0\%$ (BENDALI-AHCÈNE et al., 1995).

Os valores absolutos para as diferentes subpopulações linfocitárias são estabelecidos com base na contagem global dos leucócitos e na fórmula linfocitária absoluta. Para os eqüinos os valores reportados são: 3960 linfócitos/mm³, 1057 linfócitos-B/mm³, 1939 linfócitos-T CD4+/mm³, 502 linfócitos-T CD8+/mm³, 2621 linfócitos CD5+/mm³, 561 células nulas/mm³, 280 linfócitos-B CD5+ [(CD5+)- (CD4+ + CD8+)]/mm³ e a razão CD4:CD8 é 3,86 (BENDALI-AHCÈNE et al., 1995).

Akens et al. (1997) compararam duas técnicas de preparação dos linfócitos para análise na citometria de fluxo, o método de separação por gradiente em Ficoll-Paque® (Pharmacia, Upssala, Sweden), que é o método mais utilizado, e o método de lise do sangue total, conseguindo uma boa correlação entre os resultados das contagens de linfócitos usando as duas técnicas. No entanto, o método de lise do sangue total

mostrou maior reprodutibilidade e exatidão na quantificação de subpopulações linfocitárias, além de ser uma técnica mais rápida.

Em 1995, no “Second Equine Leucocyte Antigen Workshop” em Squaw Valley (CA) definiu-se os anticorpos monoclonais que marcam os leucócitos eqüinos. Para a identificação das células linfocitárias eqüinas, ou seja, pan-T eqüinas definiu-se que poderiam ser utilizados os marcadores de superfície CD3 ou CD5; para os linfócitos T auxiliares, definiu-se como principal marcador de superfície o CD4; e, finalmente, para os linfócitos T citotóxicos, o CD8 (LUNN et al., 1998).

2.4 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DO CORDÃO UMBILICAL E DOS ANEXOS FETAIS DE EQÜINOS

O cordão umbilical é um anexo fetal que se caracteriza como uma estrutura funicular de conexão do feto com a placenta, e acha-se precocemente presente no desenvolvimento embrionário. Em eqüinos, ele ancora o feto no seu sítio de implantação, junto à parede dorsal do útero, sendo composto pelas regiões amniótica e alantoídea. Os componentes do cordão umbilical referentes à região amniótica incluem o úracó, vestígio do saco vitelínico, duas artérias que, às vezes, estão anastomosadas, duas veias que, normalmente, se anastomosam nesta região, presença de granulação na face externa que seria uma hiperplasia celular no sentido de armazenar glicose e geléia de Wharton. Já os componentes da região alantoideana incluem duas artérias, às vezes, também, anastomosadas, duas veias e abertura do úracó para a cavidade alantoídea pela região infundibular (WHITWELL, 1975; TONIOLLO; VICENTE, 1996).

Segundo Toniollo e Vicente (1996), nos eqüinos, o comprimento do cordão umbilical equivale à metade do comprimento do feto, chegando a medir até 50 centímetros. Normalmente se apresenta espiralado no sentido horário, e possui um ponto de fragilidade anatômica a 2,5 a 5,0 cm do abdome do feto onde ocorre sua ruptura ao nascimento. Já Whitwell (1975), estudando a anatomia de cordões umbilicais de potros da raça Puro Sangue Inglês encontrou cordões umbilicais de até 95 cm de comprimento, não evidenciando correlação entre o comprimento do cordão umbilical e o

período de vida intra-uterina, peso, sexo ou viabilidade dos potros, nem idade da égua ou ocorrência de gestação gemelar.

Carvalho (1999), estudando os aspectos morfológicos do cordão umbilical em eqüinos, demonstrou que, os vasos umbilicais apresentam-se em número de três, sendo duas artérias e uma veia entremeadas, juntamente com o ducto alantóide (Figura 2), na geléia de Wharton e envoltos pelo epitélio amniótico.

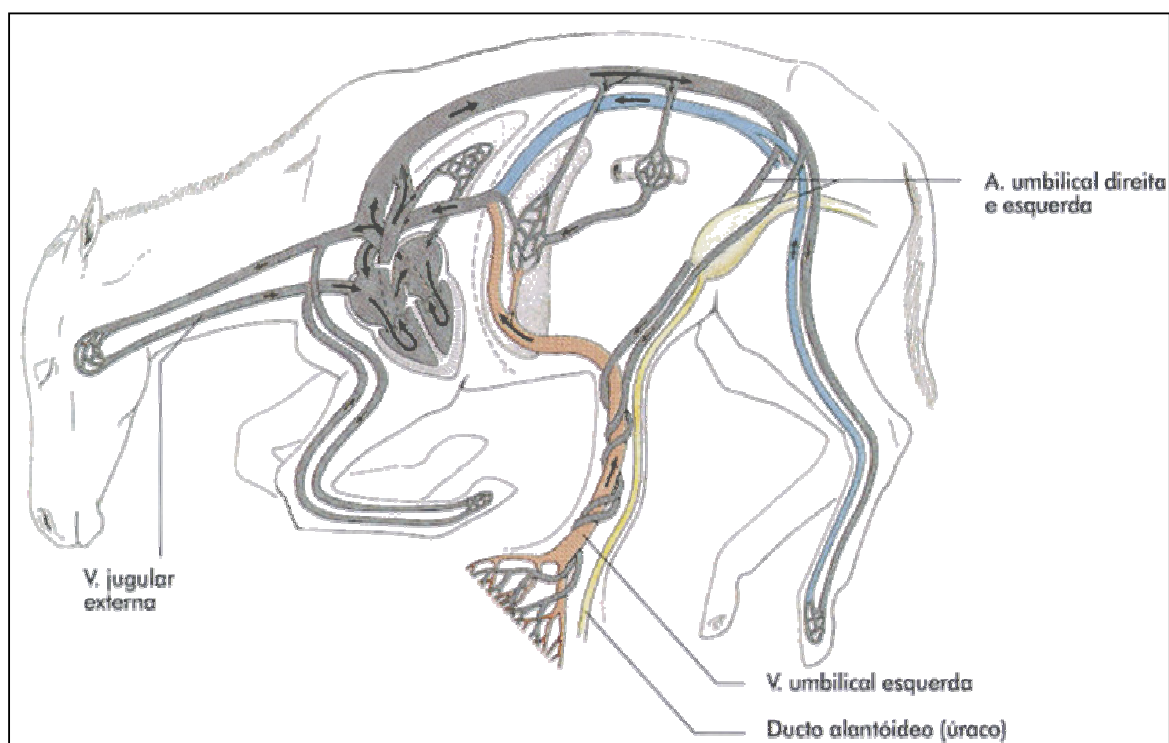


Figura 2. Representação esquemática da circulação fetal, evidenciando os vasos do cordão umbilical (duas artérias e uma veia) e o ducto alantóide (KÖNIG; LIEBICH, 2004).

No cordão umbilical dos eqüinos, a veia ocupa uma posição mais cranial em relação às artérias, estas em posição caudal e esquerda; o ducto alantóide localiza-se em posição mediana; observa-se também os *vasa vasorum*. As anastomoses arteriovenosas estão presentes nas porções média e justaplacentária do cordão umbilical. As anastomoses têm o importante papel de impedir a obstrução do cordão umbilical durante as torções fetais, fato muito freqüente nos eqüinos. A veia e as artérias têm suas paredes constituídas por uma túnica interna ou íntima, uma túnica média (com muscular bem desenvolvida) e uma túnica externa ou adventícia. A luz da veia apresenta um aspecto estrelado, quase obliterado e as luzes das artérias possuem um aspecto circular ou irregular em toda sua extensão (CARVALHO, 1999).

2.5 VALORES ERITROLEUCOMÉTRICOS DE REFERÊNCIA EM POTROS AO NASCIMENTO

2.5.1 Valores eritrométricos de referência em potros ao nascimento

Há poucos trabalhos publicados sobre valores eritroleucométricos normais de fetos e neonatos eqüinos (ALLEN et al., 1998). Também é fato que o sangue de fetos humanos e de vários animais, incluindo camundongos, ratos, coelhos, gatos, cães, porcos, ovelhas, bovinos, cavalos e elefantes africanos, tem sido alvo de estudos muito recentemente. Segundo Allen et al. (1998), nestas espécies a contagem global de hemácias, a dosagem de hemoglobina e o hematócrito, durante o período de vida intra-uterina, iniciam-se com valores baixos e aumentam progressivamente, atingindo seus maiores valores no final da vida intra-uterina, ou seja, ao nascimento.

Os valores do hematócrito e a concentração de hemoglobina atingem patamares similares aos de eqüídeos adultos por volta de 300 dias de vida intra-uterina, e, ao nascimento, estes valores variam de 40-52% para o hematócrito e 13,0-19,9 g/dL para a concentração de hemoglobina, como verificado em potros das raças Quarto de Milha e Puro Sangue Inglês (JEFFCOTT; ROSSDALE; LEADON, 1982; HARVEY, 1990). Deve ser ressaltado que, logo após o nascimento, 80% da hemoglobina referem-se à hemoglobina fetal (MEDEIROS et al., 1971).

De acordo com Harvey et al. (1984; 1987) e Harvey (1990), a contagem global de hemácias em potros ao nascimento ($9,3-12,9 \times 10^6/\mu\text{L}$) acha-se dentro ou acima dos limites considerados normais para cavalos adultos. Segundo Medeiros et al. (1971), ao nascimento, logo após o estabelecimento da respiração alveolar, não se faz mais necessária uma superfície carreadora de oxigênio tão grande quanto no período de vida intra-uterina, e o excesso de células vermelhas é destruído, o que explica a hemólise fisiológica que ocorre nesta ocasião.

O VCM revela-se elevado durante o início do desenvolvimento fetal, e decai para próximo dos valores normais de eqüinos adultos aos 300 dias de vida intra-uterina e, ao nascimento, situa-se entre 37-45 fL (JEFFCOTT; ROSSDALE; LEADON, 1982). No aspecto morfológico um achado freqüente no sangue dos eqüinos neonatos é a anisocitose (ALLEN et al., 1998). O tamanho da hemácia do potro, no início do período de vida intra-uterina, é maior que aquele verificado nas hemácias de eqüinos adultos, mas diminui durante a evolução fetal. A população de hemácias no sangue fetal, de eqüino, exibe muitas evidências de imaturidade tais como presença flagrante de eritroblastos, reticulócitos e policromasia. Nos fetos, em seus estágios iniciais de desenvolvimento, todas as hemácias apresentam-se nucleadas. Mas o número de eritroblastos decresce rapidamente e é muito baixo ou nulo quando se aproxima o nascimento, ocasião em que os eritrócitos nucleados e reticulócitos desaparecem do sangue circulante de neonatos eqüinos (ALLEN et al., 1998).

Experimentalmente, Medeiros et al. (1971) consideraram que a característica marcante do sangue circulante dos potros é a ausência de reticulócitos, como ocorre nos adultos. A possível explicação para este fenômeno é que nos eqüinos a liberação de eritrócitos a partir da medula óssea somente ocorre quando eles estão maduros.

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é constante durante o desenvolvimento fetal, assim como do nascimento até a vida adulta, variando de 32 a 40 g/dL (HARVEY, 1990; ALLEN et al., 1998).

Wintrobe e Shumacker (1935), num dos estudos pioneiros de hematologia de neonatos em humanos, suínos, coelhos, ratos, felinos e caninos, reportaram que, ao nascimento, os neonatos tendem a apresentar valores eritrométricos mais próximos daqueles verificados em adultos de espécies mamíferas cujo período gestacional é

mais longo. De outra parte, tem sido referido não haver diferenças significativas no quadro eritrocitário, entre machos e fêmeas, nos neonatos eqüinos (MEDEIROS et al., 1971).

2.5.2 Valores leucométricos de referência em potros ao nascimento

A contagem global de leucócitos em potros ao nascimento varia de 4,9 a 12,0 x 10³/μL de sangue (LASSEN; SWARDSON, 1995). No primeiro dia de vida observa-se a tríade neutrofilia, linfopenia e basopenia, fato que também se verifica em neonatos de outras espécies. Tal quadro leucocitário é atribuído à reação do sistema adrenocortical do potro em resposta ao estresse do nascimento ou à atividade do supracitado sistema na parturiente, influenciando o potro por intermédio da circulação placentária (MEDEIROS et al., 1971).

a) Neutrófilos

O número de neutrófilos segmentados é baixo no sangue periférico de fetos eqüinos (<1500 neutrófilos segmentados/μL de sangue), até os 300 dias de vida intra-uterina. Após este período, o número de neutrófilos segmentados aumenta, chegando a valores médios de 5500 neutrófilos segmentados/μL de sangue, ao nascimento. Neutrófilos bastonetes estão ausentes ou em número muito reduzido em potros a termo e não excede a 150/μL (HARVEY, 1990).

Em potros prematuros a contagem de neutrófilos é mais baixa do que em potros a termo, pois o córtex adrenal naqueles não responde adequadamente ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) endógeno, nem exógeno (CHAVATTE et al., 1991).

b) Linfócitos

Nos dois terços finais de vida intra-uterina, os eqüinos apresentam contagens linfocitárias que se aproximam daquelas dos polimorfonucleares neutrofílicos, alcançando valores em torno de 3000 linfócitos/μL de sangue (JEFFCOTT; ROSSDALE; LEADON, 1982; FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Entretanto, tais valores diminuem para cerca de 1400 linfócitos/μL, poucas horas após o nascimento (HARVEY,

1990). Tal linfopenia é atribuída à reação do sistema adrenocortical do potro em resposta ao estresse do nascimento, ou à atividade do supracitado sistema na parturiente, influenciando o potro por intermédio da circulação placentária (MEDEIROS et al., 1971).

Com base nos indicadores do quadro linfocitário durante o período neonatal, alguns autores admitem que contagens de linfócitos inferiores a 1000/ μ L são utilizadas como um dos critérios para diagnóstico da imunodeficiência combinada em potros, conquanto que alguns potros a termo podem apresentar contagens de linfócitos muito baixas (HARVEY, 1990).

Muitos dos valores leucométricos obtidos em potros neonatos, especialmente a relação de neutrófilos: linfócitos (N:L), podem ser utilizados para confirmar a prematuridade e imaturidade em potros e oferecer um prognóstico para a sobrevivência. A relação N:L em potros, a termo, varia de 2:1 a 6:1 (ALLEN et al., 1998). Por outro lado, em potros prematuros o quociente da relação N:L é de $0,68 \pm 0,22$ (CHAVATTE et al., 1991).

c) Basófilos e Eosinófilos

Os eosinófilos e basófilos geralmente estão ausentes no sangue circulante do potro ao nascimento (HARVEY, 1990).

Os basófilos aparecem em número relativamente estável desde o nascimento até a vida adulta e seus valores absolutos ao nascimento são $0-0,02 \times 10^3 / \mu$ L (HARVEY, 1990; FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Medeiros et al. (1971) observaram ausência de basófilos no sangue de neonatos eqüinos e relacionaram-na com degranulação precoce das células basofílicas.

A ausência de eosinófilos é atribuída a um retardo ou falha na estimulação da granulopoiese, ainda intra-uterinamente, mas este mecanismo ainda não está bem esclarecido (ALLEN et al., 1998). Os eosinófilos só aparecem no sangue circulante de potros à partir de 07 dias de vida (MEDEIROS et al., 1971).

d) Monócitos

Os monócitos aparecem em número relativamente estável desde o nascimento até a vida adulta e seus valores absolutos ao nascimento são $0,04-0,43 \times 10^3 /\mu\text{L}$ (HARVEY, 1990; FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Para o desenvolvimento deste ensaio, contou-se com o irrestrito apoio do Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/Unesp), com estreita colaboração do Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto/SP, sediado no Centro de Terapia Celular (CTC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), bem como do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana/ Colina/SP .

3.2 PARCELAS EXPERIMENTAIS

Os seguintes grupos experimentais foram constituídos:

- Grupo E1 - sangue da jugular de neonatos eqüinos;
- Grupo E2- SCU eqüino;

Foram colhidas amostras de sangue do cordão umbilical e da jugular de 20 neonatos eqüinos (*Equus caballus*, Linnaeus, 1758), sendo sete machos e 13 fêmeas, da raça Brasileiro de Hipismo, oriundos de éguas inseminadas artificialmente. As fêmeas parturientes foram avaliadas quanto ao exame clínico, hemograma, vacinações e vermifugações e foram consideradas híginas.

3.3 COLHEITA DO SANGUE

As colheitas de sangue foram realizadas nos meses de novembro de 2005 a janeiro de 2006, por ocasião da estação de partos.

As éguas eram mantidas em criação extensiva durante a gestação e, aproximadamente, 20 dias antes da data prevista para o parto, considerando-se o tempo de gestação médio para eqüinos de 330 dias, eram transferidas para um piquete maternidade, onde eram mantidas durante o período diurno. No período noturno, as fêmeas eram alojadas em baias, para facilitar o parto assistido e a ambientação adequada para a colheita do material.

Durante a noite, ocasião em que normalmente ocorrem os partos de eqüinos, as gestantes eram monitoradas a cada 30 minutos. Aos primeiros sinais de trabalho de parto, as fêmeas eram assistidas até o nascimento do potro e concomitante colheita das amostras.

Geralmente o potro nasce em apresentação longitudinal e a parturiente permanece em decúbito esternal nos estágios finais do parto e por aproximadamente mais 20 minutos após a completa expulsão do potro. Pelo tamanho relativamente longo do cordão umbilical na espécie eqüina, seu rompimento ocorre alguns minutos após o nascimento, a menos que haja interferência humana. Durante este período, os vasos do cordão estão facilmente acessíveis (ROSSDALE, 1968).

Imediatamente após o nascimento, as amostras do SCU (5 mL) foram colhidas, antes da dequitação placentária, através de punção da veia umbilical, sem clampeamento. O sangue central (5 mL) foi colhido por venipunção jugular. As colheitas de sangue foram realizadas utilizando-se um sistema a vácuo em frascos contendo ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA – 1mg/mL), para realização do hemograma e citometria de fluxo.

As amostras foram devidamente identificadas e mantidas refrigeradas durante o transporte até o laboratório.

3.4 PROCESSAMENTO DO SANGUE

3.4.1 Avaliação hematológica

O sangue do cordão umbilical e o sangue da jugular foram submetidos a estudos laboratoriais, incluindo contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como a determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina, todos com o auxílio do contador automático de células (ACT Coulter, Coulter). A partir dos valores obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina, calcularam-se o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sangüíneos corados com Metanol, May-Grunwald e Giemsa (MMG), enumerando-se 100 células e estabelecendo-se as fórmulas leucocitárias relativa e absoluta.

3.4.2 Avaliação citofluorométrica

Os estudos citofluorométricos foram realizados em prazo máximo de 24 horas. As alíquotas de SCU e de sangue da jugular foram encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto/SP, para serem submetidas a estudos citofluorométricos.

Inicialmente foi feita a identificação de quatro tubos estéreis para cada amostra. As identificações foram tubo 1- γ 1RPE, tubo 2- CD4RPE, tubo 3- CD5RPE e tubo 4- CD8RPE. Em cada tubo foram adicionados 100 μ L de sangue total e 10 μ L dos respectivos reagentes: controle negativo γ 1RPE (MCA928, Serotec) no tubo 1; anticorpo monoclonal eqüino anti-CD4⁺(MCA1078, Serotec) no tubo 2; anticorpo monoclonal eqüino anti-CD5⁺(MCA1079, Serotec) no tubo 3; e anticorpo monoclonal eqüino anti-CD8⁺(MCA2385, Serotec) no tubo 4. Os tubos foram incubados no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente.

Adicionou-se 1 mL de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson) em cada tubo, seguido de homogeneização, e novamente incubados na ausência de luz por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão de células foi centrifugada (IEC Centra CL2 Centrifuge, Thermo Electron Corporation) à 500 g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 2 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6 (PBS). Este procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células foi repetida duas vezes.

Após a segunda lavagem das células, foram adicionados 5 µL do anticorpo secundário (F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG:RPE) conjugado ao fluorocromo RPE (R ficoeritrina) (STAR12A, Serotec). Os tubos foram incubados mais uma vez, durante 15 minutos, em ambiente escuro e à temperatura ambiente. Adicionaram-se 2 mL de PBS e realizaram-se os procedimentos de lavagem das células novamente. Após o descarte do sobrenadante na última lavagem, as células foram ressuspensas com 400 µL de PBS.

As amostras foram submetidas à análise no citofluorômetro (FACS Calibur, Becton Dickinson) para identificação e contagem das subpopulações linfocitárias.

Os dados lidos no citômetro de fluxo foram analisados por um programa de computador (Cell Quest Pro Software, Becton Dickinson), que forneceu o histograma e tabela com a quantidade de células detectadas pela imunofenotipagem (Figura 3).

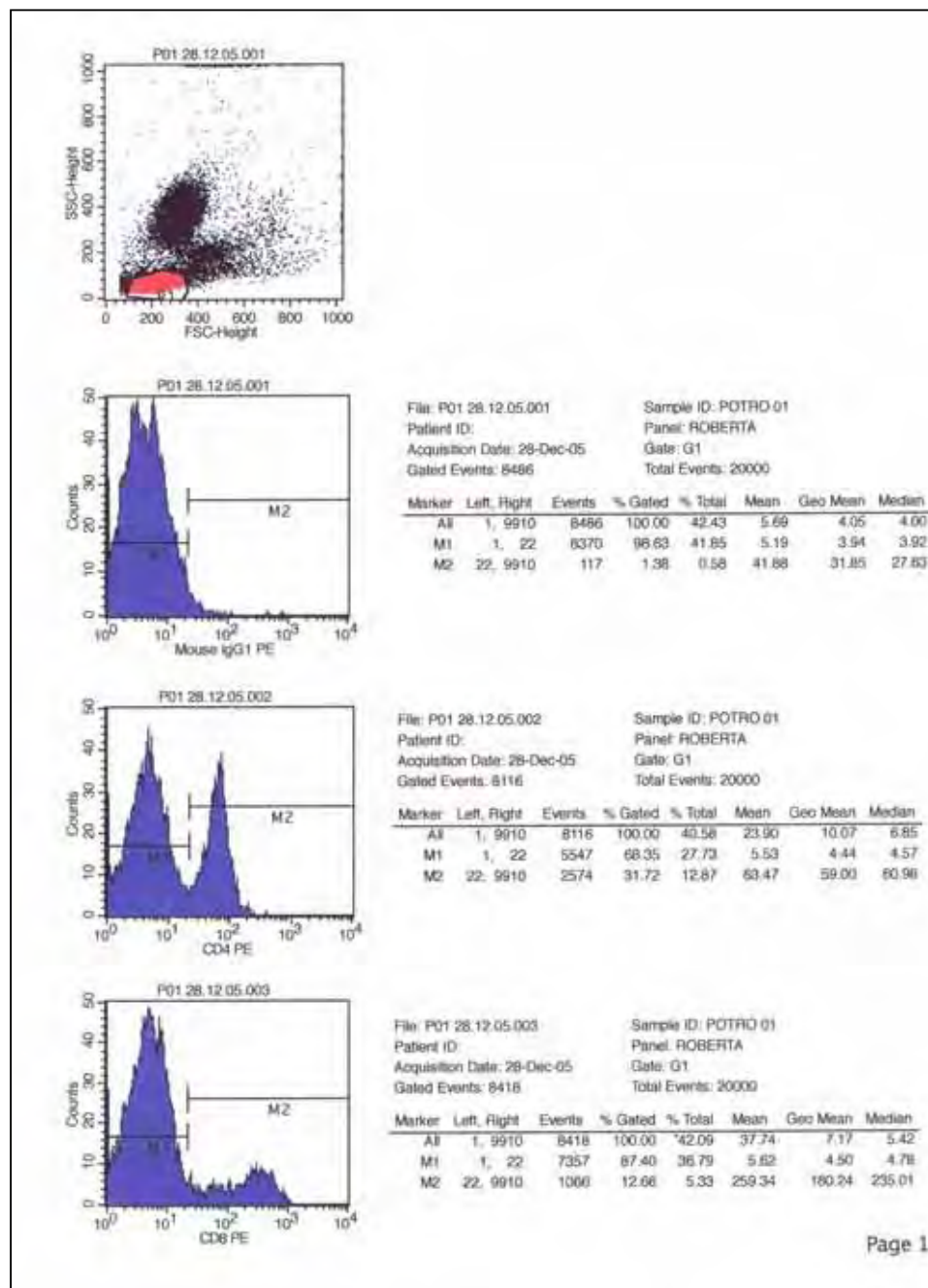


Figura 3. Ilustração da representação gráfica da leitura das células sangüíneas por tamanho e complexidade, controle negativo e distribuição de subpopulações linfocitárias CD4⁺RPE e CD8⁺RPE, no sangue do cordão umbilical eqüino, após leitura citofluorométrica.

3.5 CÁLCULO DA QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS

As contagens de CD5⁺/μL, CD4⁺/μL e CD8⁺/μL foram estabelecidas pela seguinte fórmula:

$$\text{Subpopulação linfocitária}/\mu\text{L} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de eventos (\%)} \times \text{contagem absoluta de linfócitos}}{100}$$

Sendo:

Número de eventos = contagem de células positivas para CD5⁺, CD4⁺ ou CD8⁺.

A razão CD4:CD8 foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{CD4:CD8} = \frac{\text{CD4}^+}{\text{CD8}^+}$$

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas; contagem diferencial de leucócitos; determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina, assim como, contagem dos linfócitos pan-T, linfócitos T auxiliares e T citotóxicos/supressores do sangue do cordão umbilical e jugular de eqüinos neonatos, foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva simples, seguida do teste *F* (*p*<0,05) para a devida confrontação entre as médias dos dois grupos (STELL; TORRIE, 1960; SNEDECOR; COCHRAN, 1987).

4. RESULTADOS

Quanto à colheita do SCU, a mesma não apresentou nenhuma dificuldade, sendo realizada na veia umbilical, com a placenta *in loco* em todos os potros.

Os valores médios obtidos para os diferentes parâmetros eritroleucométricos e citofluorométricos, dos dois grupos estudados (sangue periférico de neonatos eqüinos - E1 e SCU eqüino - E2), estão apresentados nas Tabelas 1 a 3 e Figuras 4 a 6.

4.1 ERITROGRAMA

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), nos dois grupos estudados, estão apresentados na Tabela 1 e Figura 4.

Em relação às contagens globais de hemácias, os valores médios e desvios padrão obtidos no sangue jugular de eqüinos neonatos (E1) e no SCU eqüino (E2) foram de $9,02 \pm 0,61 \times 10^6$ células/ μ L e $9,06 \pm 0,38 \times 10^6$ células/ μ L, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores médios.

Quanto à concentração de hemoglobina, foram obtidos os valores médios e desvios-padrão de $13,23 \pm 0,66$ g/dL e $13,12 \pm 0,39$ g/dL, para o sangue jugular de eqüinos neonatos (E1) e o SCU eqüino (E2), respectivamente. Não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos E1 e E2 quanto a este parâmetro.

Os valores médios obtidos para o HT, no sangue jugular de eqüinos neonatos (E1) e no SCU eqüino (E2) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$), sendo que os respectivos valores médios e desvios-padrão foram de $37,44 \pm 1,31\%$ e $38,56 \pm 1,07\%$.

Tabela 1. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.

GRUPOS	CONT. GLOBAL DE HEMÁCIAS (X 10 ⁶ /µL)		CONC. DE HEMOGLOBINA (g/dL)		HEMATÓCRITO (%)		VCM (fL)		CHCM (g/dL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
E1	9,02 A	0,61	13,23 A	0,66	37,44 A	1,31	41,67 A	3,25	35,37 A	2,04
E2	9,06 A	0,38	13,12 A	0,39	38,56 A	1,07	42,62 A	1,97	34,09 A	3,13

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si (p>0,05) e estabelecem a comparação entre grupos

E1– Sangue da jugular de neonatos eqüinos.

E2– SCU eqüino.

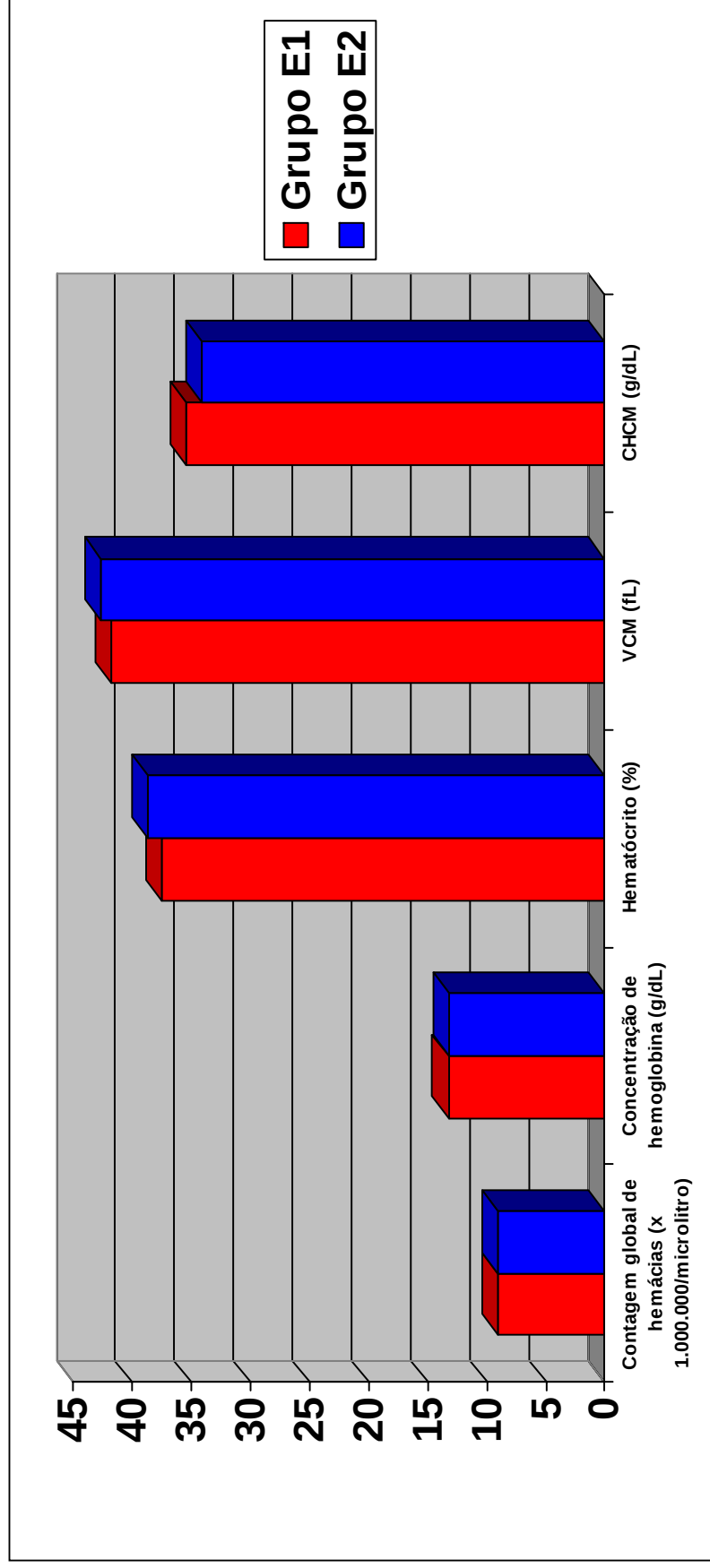


Figura 4. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.

O VCM apresentou valor médio e desvio padrão de $41,67 \pm 3,25$ fL para o sangue jugular de eqüinos neonatos (E1) e de $42,62 \pm 1,97$ fL para o SCU eqüino (E2). No entanto, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

Com relação à CHCM, não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o valor médio obtido no sangue da jugular de neonatos eqüinos (E1) ($35,37 \pm 2,04$ g/dL) em relação àquele obtido no sangue do cordão umbilical eqüino (E2) ($34,09 \pm 3,13$ g/dL).

4.2 LEUCOGRAMA

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens globais de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, nos dois grupos estudados, estão apresentados na Tabela 2 e Figura 5.

A presença de eosinófilos e basófilos não foi verificada em nenhuma amostra dos dois grupos (E1 e E2).

O leucograma do SCU (E2) e da jugular dos eqüinos neonatos (E1) revelou valores médios e desvios-padrão equivalentes à $6,29 \pm 0,74 \times 10^3$ leucócitos/ μ L e à $5,68 \pm 0,76 \times 10^3$ leucócitos/ μ L, respectivamente, porém não se verificou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois grupos.

A fórmula leucocitária obtida para neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos no sangue da jugular de neonatos (E1) apresentaram os valores médios de: $0,03 \pm 0,03 \times 10^3$ células/ μ L, $2,99 \pm 0,60 \times 10^3$ células/ μ L, $3,21 \pm 0,56 \times 10^3$ células/ μ L e $1,22 \pm 0,97 \times 10^3$ células/ μ L, respectivamente. Já os valores médios obtidos para os mesmos parâmetros, porém no SCU de eqüinos (E2), foram, respectivamente, de: $0,03 \pm 0,03 \times 10^3$ células/ μ L, $2,72 \pm 0,61 \times 10^3$ células/ μ L, $2,86 \pm 0,26 \times 10^3$ células/ μ L e $1,11 \pm 1,05 \times 10^3$ células/ μ L. Quando comparados para tais parâmetros os grupos E1 e E2 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 2. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.

GRUPOS	CONT. GLOBAL DE LEUCÓCITOS (X 10 ³ /μL)		NEUTRÓFILOS BASTONETES (X 10 ³ /μL)		NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS (X 10 ³ /μL)		LINFÓCITOS (X 10 ³ /μL)		MONÓCITOS (X 10 ³ /μL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
E1	6,29 A	0,74	0,03 A	0,03	2,99 A	0,60	3,21 A	0,56	1,22 A	0,97
E2	5,68 A	0,76	0,03 A	0,03	2,72 A	0,61	2,86 A	0,26	1,11 A	1,05

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si (p>0,05) e estabelecem a comparação entre grupos

E1– Sangue da jugular de neonatos eqüinos.

E2– SCU eqüino.

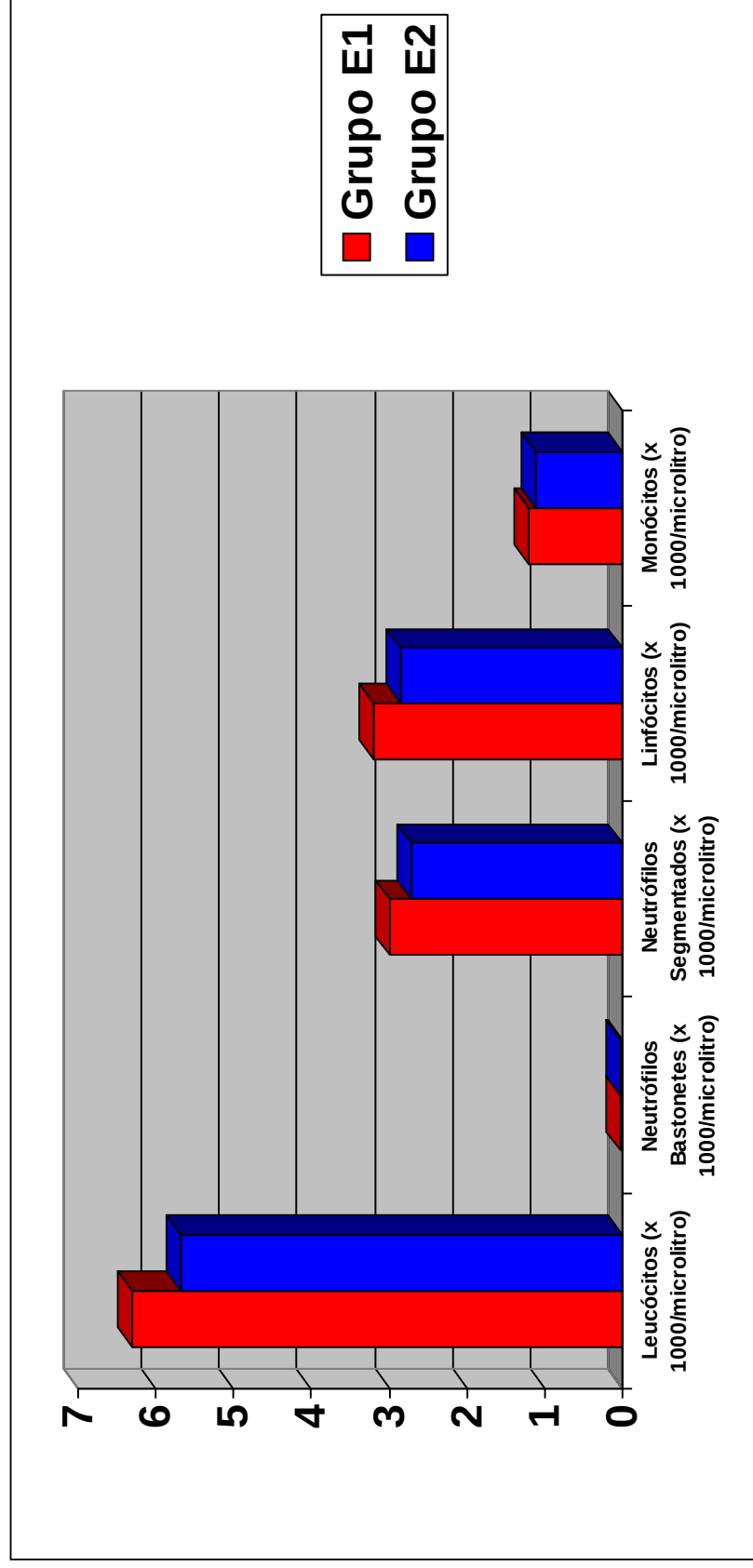


Figura 5. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.

4.3 IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens de células $CD5^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ e razão $CD4^+:CD8^+$, obtidos por meio da citometria de fluxo em neonatos eqüinos (E1) e SCU eqüino (E2), estão apresentados na Tabela 3 e Figura 6.

Os valores médios e desvios padrão de células pan-T ($CD5^+$), T auxiliares ($CD4^+$), T citotóxicas ($CD8^+$) e a relação de células $CD4^+:CD8^+$ obtidos através do método de citometria de fluxo, no sangue jugular de neonatos eqüinos (E1), foram $1621 \pm 410,69$ células/ μ L, $1001 \pm 166,02$ células/ μ L, $473 \pm 230,19$ células/ μ L e $2,41 \pm 0,81$, respectivamente. Já para o SCU eqüino (E2), os valores médios e desvios padrão para tais variáveis foram $1429 \pm 234,49$ células/ μ L, $918 \pm 142,43$ células/ μ L, $381 \pm 118,42$ células/ μ L e $2,64 \pm 0,91$, respectivamente. Os valores médios dos grupos E1 e E2 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparados entre si.

No grupo E1 e no grupo E2, a porcentagem de linfócitos B que expressaram o antígeno CD5 [$(CD5^+) - (CD4^+ + CD8^+)$] foi de 9,1% e de 9,02%, respectivamente.

4.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS SANGÜÍNEAS NAS PREPARAÇÕES CITOSCÓPICAS

Nos esfregaços sangüíneos, obtidos a partir de venipunção da jugular e cordão umbilical de neonatos eqüinos, observados à microscopia de luz, verificou-se anisocitose.

Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens de células CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e razão CD4⁺:CD8⁺, obtidos por meio da citometria de fluxo do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.

GRUPOS	CD5 ⁺ (células/ μ L)		CD4 ⁺ (células/ μ L)		CD8 ⁺ (células/ μ L)		CD4 ⁺ :CD8 ⁺	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
E1	1621,00 A	410, 69	1001,00 A	166,02	473,00 A	230,19	2,41 A	0,81
E2	1429,00 A	234,49	918,00 A	142,43	381,00 A	118,42	2,64 A	0,91

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($p>0,05$) e estabelecem a comparação entre grupos

E1– Sangue da jugular de neonatos eqüinos.

E2– SCU eqüino.

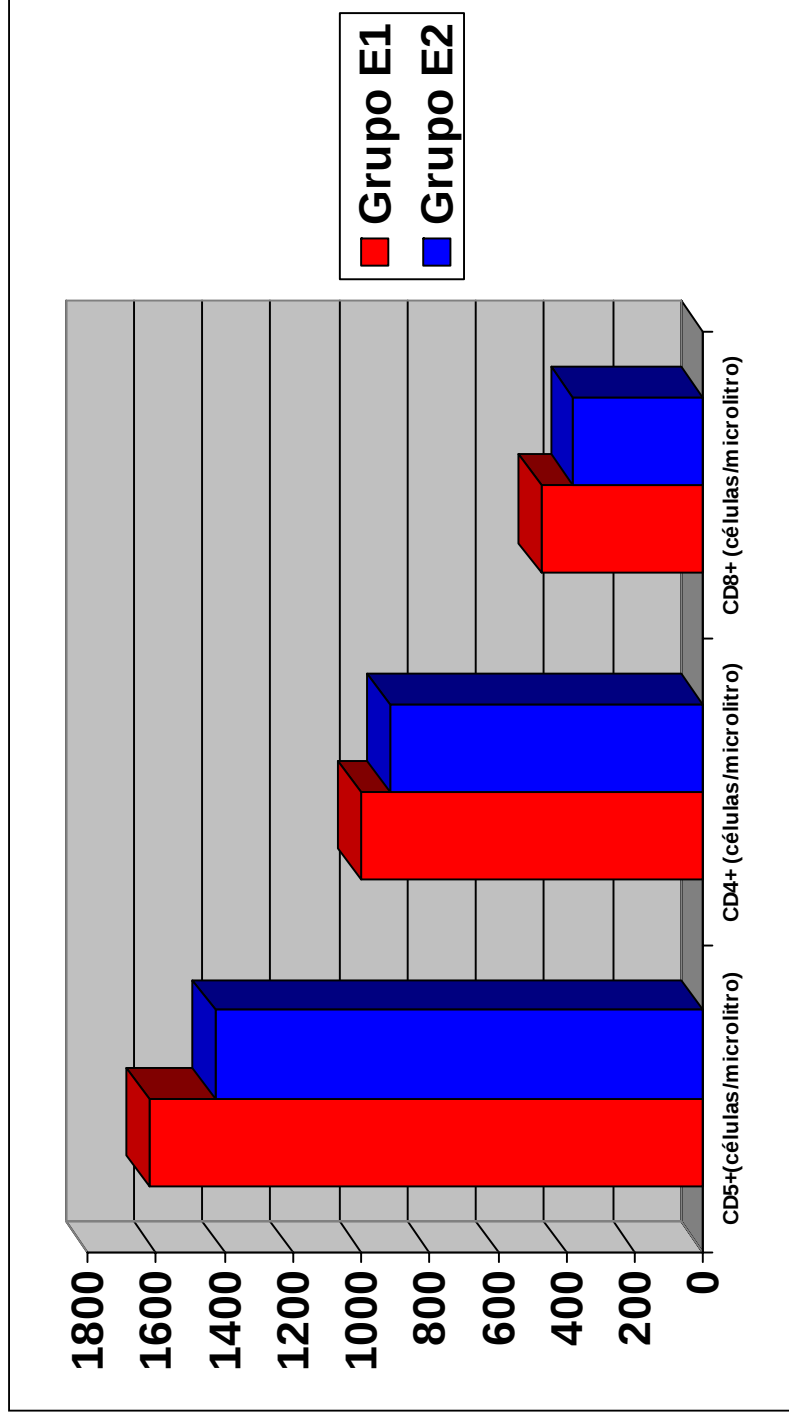


Figura 6. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens de células CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺, obtidas por meio da citometria de fluxo do sangue colhido na jugular (E1) e no cordão umbilical (E2) em neonatos eqüinos (n=20). Jaboticabal (SP), 2006.

5. DISCUSSÃO

Neste ensaio, a colheita do sangue do cordão umbilical de eqüinos nascidos a termo foi realizada por venipunção umbilical, imediatamente após o parto, antes mesmo da dequitação placentária, momento em que os vasos umbilicais estão facilmente acessíveis (ROSSDALE, 1968). Devido ao seu comprimento, que chega à 50 cm (TONIOLLO; VICENTE, 1996), não houve dificuldade para a colheita do SCU nesta espécie. Além do comprimento do cordão umbilical, o fato dos vasos umbilicais serem bastante calibrosos facilita a colheita de volume suficiente para as análises. A colheita do sangue dos neonatos foi realizada por venipunção jugular, imediatamente após a colheita do SCU do mesmo animal, sendo desnecessário o prévio clampeamento.

Os valores médios obtidos para contagens globais de hemácias, no sangue da jugular de eqüinos neonatos (E1) ($9,02 \pm 0,61 \times 10^6$ células/ μL), apresentaram-se levemente abaixo daqueles considerados fisiológicos para potros ao nascimento (HARVEY, 1990). Deve ser ressaltado, entretanto, que Harvey (1990) utilizou-se de potros das raças Quarto de Milha e Puro Sangue Inglês para o estabelecimento de uma faixa de normalidade de parâmetros eritroleucométricos e, neste estudo, as análises de sangue de potros eqüinos foram realizadas em animais da raça Brasileiro de Hipismo.

No SCU eqüino (E2), os valores médios obtidos para contagens globais de hemácias ($9,06 \pm 0,38 \times 10^6$ células/ μL) também se mostraram levemente inferiores à faixa de normalidade reportada para potros ao nascimento por alguns autores, dentre os quais Harvey et al. (1984; 1987), Harvey (1990) e Allen et al. (1998).

Neste experimento, tanto o sangue da jugular (E1) quanto o SCU (E2) de neonatos eqüinos apresentaram valores médios para contagens globais de hemácias dentro da faixa de normalidade proposta por Jain (1986), para eqüinos adultos, corroborando as afirmativas de Harvey et al. (1984; 1987) e Harvey (1990). Achado divergente foi relatado por Pranke et al. (2001), em seres humanos, cujo número de

hemácias revelou-se maior no SCU do que naquele obtido a partir da veia braquiocéfálica de adultos.

O fato das contagens globais de hemácias no sangue da jugular e do cordão umbilical eqüino (E1 e E2) haverem se situado na faixa de normalidade para animais adultos pode ser atribuído à hemólise fisiológica que ocorre logo após o nascimento. Nesta ocasião, o número de hemácias decai para valores menores que os valores encontrados intra-uterinamente, estes sim superiores aos valores normais para eqüinos adultos (MEDEIROS, 1971).

Quando confrontados, os grupos E1 e E2 não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), para as contagens globais de hemácias, corroborando os achados de Godoy (2003).

Os valores médios obtidos para concentrações de hemoglobina no sangue da jugular de eqüinos neonatos ($13,23\pm0,66$ g/dL) e no SCU ($13,12\pm0,39$ g/dL) são comparáveis àqueles relatados por Jeffcott, Rossdale e Leadon (1982) e por Harvey (1990). Ambas amostras apresentaram valores médios dentro dos valores de normalidade propostos por Jain (1986) para eqüinos adultos, discordando de Jeffcott, Rossdale e Leadon (1982); Harvey (1990) e Godoy (2003) que se referem a valores de concentração de hemoglobina maiores no sangue do neonato eqüinos, quando comparado ao sangue de animais adultos.

Adicionalmente, Godoy (2003) e Godoy et al. (2004) se referem à concentração de hemoglobina no SCU eqüino superior à do sangue obtido na jugular em eqüinos adultos. As observações destes autores também foram reportadas em seres humanos por Rubinstein et al. (1995) e Chaisiripoomkere et al. (1999), cujos valores da concentração de hemoglobina no SCU foram superiores àqueles encontrados no sangue de seres humanos adultos.

Godoy (2003), assim como neste experimento, não observou diferenças significativas ($p>0,05$) entre o valor médio da concentração de hemoglobina no SCU e da jugular em neonatos eqüinos.

Com relação ao hematócrito, o sangue da jugular ($37,44 \pm 1,31\%$) e aquele do cordão umbilical ($38,56 \pm 1,07\%$) de neonatos eqüinos apresentaram valores médios ligeiramente mais baixos do que aqueles reportados para potros ao nascimento

(JEFFCOTT; ROSSDALE; LEADON, 1982; HARVEY, 1990). Ademais, conforme asseverado por estes mesmos autores, o hematócrito nos potros ao nascimento é muito similar ao dos eqüinos adultos, o que concorda com os valores médios obtidos para hematócrito no sangue da jugular (E1) e do cordão umbilical (E2) de eqüinos neonatos, neste experimento. De outra parte, tais assertivas não são válidas para humanos, já que o hematócrito obtido no SCU humano suplanta aquele obtido no sangue da veia braquiocefálica de adultos (RUBINSTEIN et al., 1995; CHAISIRIPOOMKERE et al., 1999).

Os resultados obtidos para o volume corpuscular médio (VCM), mostraram que, para este parâmetro, o sangue da jugular ($41,67 \pm 3,25$ fL) e do cordão umbilical de eqüinos neonatos ($42,62 \pm 1,97$ fL), apresentaram valores médios dentro da normalidade estabelecida por Harvey (1990) para neonatos eqüinos. Ademais, estes valores também se enquadram no padrão de normalidade para eqüinos adultos (JAIN, 1986; LASSEN; SWARDSON, 1995). Harvey (1990) refere-se a valores de VCM, em potros, ao nascimento, similares aos encontrados em adultos, uma vez que, ao nascimento, os eritroblastos e reticulócitos estão ausentes no sangue periférico da referida espécie (ALLEN et al., 1998). Tais achados diferem daqueles relatados em humanos por Rubinstein et al. (1995), Chaisiripoomkere et al. (1999), Silber et al. (2000) e Pranke et al. (2001), que se referem ao VCM no SCU humano superior ao encontrado no sangue de adultos, devido à presença de eritroblastos e reticulócitos no SCU de seres humanos.

Novamente não houve diferença significativa pela estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados no que se refere ao VCM, corroborando os achados de Godoy (2003).

Harvey (1990) e Allen et al. (1998) descreveram anisocitose como achado freqüente no sangue de neonatos eqüinos, fato que também foi verificado fartamente neste ensaio, tanto nas preparações citoscópicas do sangue do cordão umbilical quanto naquelas da jugular dos referidos neonatos.

Com relação à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), os valores médios obtidos no sangue da jugular ($35,37 \pm 2,04$ g/dL) e do cordão umbilical ($34,09 \pm 3,13$ g/dL) de eqüinos neonatos apresentaram-se dentro da variação fisiológica

reportada para potros ao nascimento (HARVEY, 1990; ALLEN et al., 1998), e adultos (JAIN, 1986), corroborando os dados observados por Harvey (1990) e Allen et al. (1998), que se referem a valores de CHCM no sangue da jugular de potros ao nascimento iguais aos do sangue da jugular de adultos. Tais observações também são válidas para seres humanos, nos quais a CHCM no SCU é semelhante àquela obtida no sangue circulante de adultos (RUBINSTEIN et al., 1995; CHAISIRIPOOMKERE et al., 1999; SILBER et al., 2000).

Os valores médios obtidos para contagens globais de leucócitos no SCU eqüino (E2) ($5,68 \pm 0,76 \times 10^3$ células/ μ L) e na jugular de neonatos eqüinos (E1) ($6,29 \pm 0,74 \times 10^3$ células/ μ L), revelaram-se menores que os observados por Harvey (1990), em neonatos eqüinos, após ingestão do colostro, mas concordam com os valores reportados por Lassen e Swardson (1995). As contagens médias de células leucocitárias, nos referidos grupos (E1 e E2), mostraram-se no limite inferior dos valores fisiológicos para eqüinos adultos, conforme reportado por Harvey (1990); Lassen e Swardson (1995) e Godoy (2003), ou seja, os valores para leucócitos totais de eqüinos ao nascimento são levemente menores que aqueles de eqüinos adultos.

As assertivas acima não se aplicam aos seres humanos, pois Rubinstein et al. (1995), Chaisiripoomkere et al. (1999) e Pranke et al. (2001) se referem a contagens de glóbulos brancos no SCU humano, superiores àquelas verificadas no sangue da veia braquiocefálica de adultos.

Godoy (2003) afirmou não haver diferença significativa entre a contagem de leucócitos do SCU quando comparada àquela da jugular de eqüinos neonatos, fato reafirmado no experimento em questão.

Os leucócitos basofílicos não foram observados no sangue da jugular (E1) e do cordão umbilical (E2) de eqüinos neonatos tal como Medeiros et al. (1971), Jain (1986) e Harvey (1990) reportaram. Segundo estes autores, freqüentemente, tais células estão ausentes no sangue circulante em potros ao nascimento, sendo o referido fato atribuído a uma degranulação precoce das células basofílicas ou a uma resposta à situação de estresse, no caso, o nascimento (MEDEIROS et al., 1971).

Do mesmo modo, os leucócitos eosinofílicos não foram observados no sangue da jugular e do cordão umbilical de neonatos eqüinos (E1 e E2), corroborando os

achados de Godoy (2003). De acordo com os relatos de Medeiros et al. (1971), os eosinófilos só aparecem no sangue circulante de eqüinos neonatos, aos sete dias de idade.

Os valores médios obtidos para as contagens absolutas de neutrófilos bastonetes se situaram dentro da normalidade e não foram verificadas diferenças no confronto entre o SCU (E2) e aquele obtido por intermédio da venipunção jugular de eqüinos neonatos (E1), tal como reportado por Godoy (2003).

As contagens absolutas de neutrófilos segmentados no sangue da jugular ($2,99 \pm 0,60 \times 10^3$ células/ μL) e umbilical ($2,72 \pm 0,61 \times 10^3$ células/ μL) de neonatos eqüinos, se situaram dentro dos valores considerados normais para potros ao nascimento, por Lassen e Swardson (1995). Porém, se situaram nos limites inferiores dos valores propostos como normais para eqüinos adultos por Jain (1986), concordando com as observações de Harvey (1990) e Chavatte et al. (1991).

Os resultados relativos às contagens absolutas de monócitos, dos dois grupos estudados, apresentaram-se dentro da variação fisiológica da espécie. Não foram observadas diferenças significativas no estudo comparativo entre o SCU (E2) e da jugular (E1) de eqüinos neonatos, no que concerne aos monócitos, ratificando os achados de Godoy (2003).

As contagens absolutas de linfócitos no sangue da jugular ($3,21 \pm 0,56 \times 10^3$ células/ μL) e umbilical ($2,86 \pm 0,26 \times 10^3$ células/ μL) de neonatos eqüinos acompanharam os valores fisiológicos para células linfocitárias em potros ao nascimento (JEFFCOTT; ROSSDALE; LEADON, 1982; JAIN, 1986; HARVEY, 1990; GODOY, 2003). Tais contagens foram superiores a 1000 linfócitos/ μL , uma possível indicação de maturidade dos potros (HARVEY, 1990). Tal como ocorreu com as demais variáveis leucocitárias, não houve diferenças nas contagens absolutas de linfócitos entre os grupos E1 e E2, como descrito por Godoy (2003).

Em imuno-hematologia humana, o estudo da função das células T no SCU tem importância considerável (LIN; CHAO, 2001), de modo que inúmeras pesquisas têm sido conduzidas para estabelecer as características imunofenotípicas de populações e subpopulações linfocitárias no SCU (MOTLEY et al., 1996; RIDINGS et al., 1996;

DIMITRIOU et al., 1998; HAGENDORENS et al., 2000; SCHUMACHER; BURKHEAD, 2000; PRANKE et al., 2001; SZABOLCS et al., 2003).

Embora existam relatos de imunofenotipagem de linfócitos no sangue de eqüinos adultos (LUNN; HOLMES; DUFFUS, 1991; BLANCHARD-CHANNEL; MOORE; STOTT, 1994; KYDD et al., 1994; AKENS et al., 1997; BENDALI-AHCÈNE et al., 1995; 1997) não existem estudos sobre as características imunofenotípicas dos linfócitos do SCU e da jugular de eqüinos neonatos.

Como definido em 1995, no “Second Equine Leucocyte Antigen Workshop”, para a identificação das células pan-T podem ser utilizados os marcadores de superfície CD3 ou CD5; para os linfócitos T auxiliares, o CD4; e, finalmente, para os linfócitos T citotóxicos, o CD8 (LUNN et al., 1998). Tais recomendações foram acatadas para a escolha dos anticorpos monoclonais utilizados neste experimento.

Os valores médios obtidos para a contagem de linfócitos CD5+ no SCU ($1429 \pm 234,49$ células/ μL) e da jugular ($1621 \pm 410,69$ células/ μL) mostraram-se inferiores àqueles obtidos por BENDALI-AHCÈNE et al. (1995) em eqüinos adultos (2621 células/ μL).

Com relação aos linfócitos CD4+ e CD8+ no SCU ($918 \pm 142,43$ células/ μL e $381 \pm 118,42$ células/ μL , respectivamente) e da jugular ($1001 \pm 166,02$ células/ μL e $473 \pm 230,19$ células/ μL , respectivamente), estes igualmente se mostraram inferiores aos valores obtidos no sangue de eqüinos adultos (1939 células/ μL e 502 células/ μL , respectivamente) por BENDALI-AHCÈNE et al. (1995).

Fato semelhante foi observado em seres humanos. Motley et al. (1996); Dimitriou et al. (1998) e Schultz et al. (2000) relataram que as células pan-T, T-auxiliares e T-citotóxicas se encontraram em menor quantidade no SCU humano quando comparadas com o sangue de seres humanos adultos.

A somatória de linfócitos CD4+ e CD8+, que deveria teoricamente representar a totalidade dos linfócitos CD5+, mostrou-se levemente inferior à quantidade de linfócitos CD5+, haja vista o fato que há uma pequena porcentagem de linfócitos-B que expressa o antígeno CD5, conforme relataram Bendali-Ahcène et al. (1997). Assim, a quantidade de linfócitos-B que expressa o antígeno CD5 pode ser estimada subtraindo-se, do número de linfócitos CD5+, a somatória dos linfócitos CD4+ e CD8+. Nos resultados

relatados pelos autores retromencionados, a porcentagem de linfócitos-B, que expressa o antígeno CD5, foi estimada em 8-10%. No ensaio em tela, a porcentagem de linfócitos-B CD5+ foi de 9,1% e de 9,02%, para os grupos E1 e E2, respectivamente, concordando com as observações supracitadas.

Considerando as variáveis imuno-hematológicas de população de linfócitos-T e subpopulações de linfócitos-T auxiliares e citotóxicos, não se verificaram diferenças entre o sangue do cordão umbilical e da jugular de eqüinos neonatos.

Em contrapartida, em imuno-hematologia de seres humano e de cães os resultados apontam menores quantidades de células pan-T, T-auxiliares e T-citotóxicas no SCU, comparadas àquelas encontradas no sangue de neonatos (SCHULTZ et al., 2000; FALDYNA et al., 2001).

O fato dos linfócitos-T se apresentarem em menor quantidade no SCU e da jugular de neonatos eqüinos, em relação aos valores encontrados em eqüinos adultos, sugere um componente imunológico ainda imaturo. Isto pode ser explicado pelo fato de algumas células expressarem as moléculas de superfície apenas após o nascimento (SCHULTZ et al., 2000).

Quanto à razão CD4:CD8, a superioridade do número de células CD4+ no sangue da jugular ($2,41 \pm 0,81$) e no SCU ($2,64 \pm 0,91$), foi verificada neste experimento. Em seres humanos tal achado foi atribuído a um mecanismo fisiológico de tolerância do sistema imune na relação entre a mãe e o feto (SCHULTZ et al., 2000).

6. CONCLUSÕES

O método de colheita do SCU, padronizado neste ensaio, permitiu a avaliação hematológica e a imunofenotipagem de linfócitos-T de eqüinos.

O sangue do cordão umbilical, bem como aquele da jugular de eqüinos neonatos apresentam balanços eritroleucométrico e das subpopulações linfocitárias, diferentes daqueles encontrados no sangue de eqüinos adultos, sendo as contagens de linfócitos CD5+ e CD4+ no SCU e jugular de neonatos eqüinos foram inferiores às aquelas reportadas para o sangue periférico de eqüinos adultos, indicando um componente imunológico imaturo.

Os valores obtidos para as variáveis eritroleucométricas, CD5+, CD4+ e CD8+, no sangue do cordão umbilical e na jugular de eqüinos neonatos, não diferem entre si, sendo, portanto, úteis para a avaliação do quadro citológico em neonatos da espécie eqüina.

A razão CD4:CD8 encontrada tanto no sangue do cordão umbilical quanto no sangue da jugular de eqüinos neonatos, indica a superioridade do número de células auxiliares, sugerindo uma tolerância imunológica entre mãe e feto.

7. REFERÊNCIAS*

AKENS, M. K. et al. Comparative analyses of equine lymphocyte subsets in whole blood and gradient-purified samples. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 58, n. 3-4, p. 231-237, 1997.

ALLEN, L. A. et al. Hematology of equine fetuses with comparisons to their dams. Veterinary Clinical Pathology, Santa Bárbara, v. 27, n. 3, p. 93-100, 1998.

BENDALI-AHCÈNE, S. et al. Flow cytometric analysis of blood lymphocyte phenotypes in horses infected with the equine infectious anemia virus. Journal of Equine Veterinary Science, Wildomar, v. 15, n. 8, p. 360-364, 1995.

BENDALI-AHCÈNE, S. et al. Lymphocyte phenotypes, apoptosis and anti-nuclear antibodies in asymptomatic horses infected by equine infectious anemia virus. Revue de Médecine Vétérinaire, Toulouse, v. 148, n. 6, p. 531-536, 1997.

BLANCHARD-CHANNEL, M.; MOORE, P. F.; STOTT, J. L. Characterization of monoclonal antibodies specific for equine homologues of CD3 and CD5. Immunology, Oxford, v. 82, n. 3, p. 548-554, 1994.

BROXMEYER, H. E. et al. Umbilical cord hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. Blood Cells, Belfast, v. 17, n. 2, p. 313-329, 1991.

BYRNE, K. M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 2, n. 73, p. 167-182, 2000.

* ABNT-NR 6023

CAREY, J. L.; HANSON, C. A. Flow cytometry analyses of leukemia and lymphoma. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A., HARTUBISE, P. E.: Flow cytometry and clinical diagnosis. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994, p.197.

CARVALHO, F. S. R. Aspectos morfológicos do funículo umbilical em eqüinos. 1999. 237 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CHASIRIPOOMKERE, W. et al. Study of hematopoietic progenitor cells, hematological values and lymphocyte subsets in cord blood: application for cord blood transplantation. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health, Bangkok, v. 30, n. 4, p. 781-785, 1999.

CHAVATTE, P. et al. Studies of bone marrow and leukocyte counts in peripheral blood in fetal and newborn foals. Journal of Reproduction and Fertility-Supplement, Oxford, v. 44, p. 603-608, 1991.

DAY, M. J. Biology of lymphocytes and plasma cells. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia:Williams & Wilkins, 2000. cap. 40. p. 240-246.

DIMITRIOU, H. et al. Phenotypic characteristics of cord blood hematopoietic cells. Leukemia Research, Oxford, v. 22, n. 8, p. 755-758, 1998.

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs-a flow cytometric study. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia:Williams & Wilkins, 2000. 1221P.

GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. New England Journal of Medicine, Waltham, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, 1989.

GODOY, R. F. Estudo eritroleucométrico e proteinograma do sangue do cordão umbilical e da jugular de eqüinos e asininos ao nascimento e de suas respectivas mães. 2003. 64 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GODOY, R. F. et al. Estudo eritroleucométrico do sangue do cordão umbilical de eqüinos neonatos. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 31, 2004, São Luís MA. Anais... CD-Rom.

GRINDEM, C. B. Blood cell markers. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 1043-1065, 1996.

HAGENDORENS, M. M. et al. Determination of T-cell subpopulations and intracellular cytokine production (interleukin-2, interleukin-4, interferon [gamma]) by cord blood T-lymphocytes of neonates from atopic and non-atopic parents. Pediatric Allergy and Immunology, Edinburg, v. 11, n. 1, p. 12-19, 2000.

HARVEY, J. W. et al. Haematology of foals up to one year old. Equine Veterinary Journal, London, v. 16, n. 4, p. 347-352, 1984.

HARVEY, J. W. et al. Serum ferritin, serum iron and erythrocyte values in foals. American Journal of Veterinary Research, Chicago, v. 48, n. 9, p. 1348-1353, 1987.

HARVEY, J. W. Normal hematologic values. In: KOTERBA, A. M.; DRUMMOND, W. H.; KOSCH, P. C. Equine clinical neonatology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 561-570.

JAIN, N. C. Schalm's Veterinary hematology. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221P.

JEFFCOTT, L. B.; ROSSDALE, P. D.; LEADON, D. P. Haematological changes in the neonatal period of normal and induced premature foals. Journal of Reproduction and Fertility-Supplement, Oxford, v. 32, p. 537-544, 1982

KEREN, D. F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D. F., HANSON, C. A., HARTUBISE, P. E.: Flow citometry and clinical diagnosis. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994, p.1.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. E. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. 1. ed. Porto Alegre:Artmed, 2004, v. 2, p. 167.

KYDD, J. et al. Report of the first international workshop on equine leukocyte antigens. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 3-60, 1994.

LASSEN, E. D.; SWARDSON, C. J. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 351-389, 1995.

LIN, S. J.; CHAO, H. C. Interleukin-15 enhances CD4⁺ CD45RA⁺ expression on umbilical cord blood mononuclear cells. Pediatric Allergy and Immunology, Edinburg, v. 12, n. 4, p. 188-193, 2001.

LU, L. et al. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. Critical Reviews in Oncology/Hematology, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 61-78, 1996.

LUNN, D. P.; HOLMES, M. A.; DUFFUS, P. H. Three monoclonal antibodies identifying antigens on all equine T lymphocytes, and two mutually exclusive T-lymphocyte subsets. Immunology, Oxford, v. 74, n. 2, p. 251-257, 1991.

LUNN, D. P. et al. Report of the second equine leucocyte antigen workshop, Squaw Valley, California, July 1995. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 101-143, 1998.

MEDEIROS, L. O. et al. Hematologic standards for healthy newborn Thoroughbred foals. Biology of the Neonate, Basel, v. 17, n. 5, p. 351-360, 1971.

MOTLEY, D. et al. Determination of lymphocyte immunophenotypic values for normal full-term cord blood. American Journal of Clinical Pathology, Philadelphia, v. 105, n. 1, p. 38-43, 1996.

PAXTON, H. et al. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. Clinical Immunology and Immunopathology, New York, v. 52, n. 1, p. 68-84, 1989.

PRANKE, P. et al. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. Acta Haematologica, Basel, v. 105, n. 4, p. 71-76, 2001.

RIDINGS, J. et al. Purification of cord blood lymphocytes. Journal of Immunological Methods, Amsterdam, v. 195, n. 1-2, p. 43-48, 1996.

RIVAS, A. L. et al. Characterization of monoclonal antibodies directed to canine T lymphocyte markers expressed during development. Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v.51, n. 1-2, p.1-11,1996.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunologia. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003. 481P.

ROMÃO, G. S.; ZAGO, M. A.; SALA, M. M. O sangue de cordão umbilical como alternativa no transplante de medula óssea. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, 1999, Foz do Iguaçu PA. Anais... CD-Rom.

ROSSDALE, P. D. Blood gas tensions and pH values in the normal Thoroughbred foal at birth and in the following 42h. Biologia Neonatorum, Basel, v. 13, n. 1, p. 18-25, 1968.

RUBINSTEIN, P. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.22, n. 92, p. 1019-1022, 1995.

SCHUMACHER, M. J., BURKHEAD, T. Stability of Fresh and Preserved Fetal and Adult Lymphocyte Cell Surface Markers. Journal of Clinical Laboratory Analysis, New York, v. 14, n. 6, p. 320-326, 2000.

SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W. G. Statistical methods. 6. ed. Ames: Iowa State University Press, 1987. 593P.

STELL, R. G.; TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics: with special reference to the biological sciences. New York: McGraw-Heel, 1960. 481P.

SURBEK, D. V. et al. Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increase cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. American Journal of Obstetrics and Gynecology, Saint Louis, v. 183, n. 1, p. 218-221, 2000.

SZABOLCS, P. et al. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T-cells as compared to adult peripheral blood. Experimental Hematology, Amsterdam, v. 31, n. 8, p. 708-714, 2003.

TIZARD, I. R. Imunologia veterinária: uma introdução. 6. ed. São Paulo:Roca, 2002. 532P.

TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. Placentas e placentação. In: TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. Manual de obstetrícia veterinária. São Paulo: Varela, 1996. p. 31-32.

TURNER, C. W., LUZINS, J., HUTCHENSON, C. A modified harvest technique for cord blood hematopoietic stem cells. Bone Marrow Transplantation, Basingstoke, v. 10, n. 1, p. 89-91, 1992.

VILMER, E. et al. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia. Transplantation, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 1155-1157, 1992.

WAGNER, J.E. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloblastic therapy: analysis of engraftment. Blood, Washington, v. 79, n. 7, p. 1874-1881, 1992.

WAGNER, J.E. Umbilical cord blood stem cell transplantation. The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology, New York, v. 15, n. 2, p. 169-174, 1993.

WINTROBE, M. M.; SHUMACKER, H. B. Erythrocyte studies in the mammalian fetus and newborn. Erythrocyte counts, hemoglobin and volume of packed red corpuscles, mean corpuscular volume, diameter and hemoglobin content, and proportion of immature red cells in the blood of fetuses and newborn of the pig, rabbit, rat, cat, dog and man. American Journal of Anatomy, Baltimore, v. 58, p. 313-328, 1935.

WHITWELL, K.E. Morphology and pathology of the equine umbilical cord. Journal of Reproduction and Fertility- Supplement, Oxford, n. 23, p. 599-603, 1975.

WONG, A. et al. Cord blood collection before and after placental delivery: levels of nucleated cells, haematopoietic progenitors cells, leukocyte subpopulations and

macroscopic clots. Bone Marrow Transplantation, Basingstoke, v. 27, n. 2, p. 133-138, 2001.

APÊNDICE

Eritroleucograma de referência para equinos adultos sadios.

Parâmetros Eritroleucométricos	Valores de Referência
→Parâmetros Eritrocitários	
-contagem global de eritrócitos	6,5 a 12,5 x 10 ⁶ /μL
-teor de hemoglobina	11 a 19 g/dL
-hematócrito	32 a 52 %
-volume corpuscular médio (VCM)	36 a 52 fL
-hemoglobina corpuscular média (HCM)	12,3 a 19,7 pg
-concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	34 a 39 g/dL(%)
-reticulócitos	-
→Parâmetros Leucocitários	
-contagem global de leucócitos	5,5 a 12,5 x 10 ³ /μL
-contagem diferencial absoluta de leucócitos	
neutrófilos segmentados	2,7 a 6,7 x 10 ³ /μL
neutrófilos bastonetes	0 a 0,1 x 10 ³ /μL
linfócitos	1,5 a 5,5 x 10 ³ /μL
monócitos	0 a 0,8 x 10 ³ /μL
eosinófilos	0 a 0,9 x 10 ³ /μL
basófilos	0 a 0,2 x 10 ³ /μL

FONTE: JAIN, 1986; LASSEN; SWARDSON, 1995.