

Roseli Pizzigatti Klein

**Avaliação da imunidade celular sob a ação
de imunomoduladores em neonatos caninos
até 45 dias de idade**

**Botucatu, SP
Janeiro, 2004**

Roseli Pizzigatti Klein

**Avaliação da imunidade celular sob a ação de
imunomoduladores em neonatos caninos
até 45 dias de idade**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária.

Área de concentração em Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Flávio Quaresma Moutinho

Botucatu, SP

Janeiro, 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Klein, Roseli Pizzigatti.

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR
SOB A AÇÃO DE IMUNOMODULADORES
EM NEONATOS CANINOS ATÉ 45 DIAS
DE IDADE / ROSELI PIZZIGATTI KLEIN. –
2004.**

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2004.

Orientador: Flávio Quaresma Moutinho

Assunto CAPES: 50501062

1. Imunologia veterinária

CDD 636.0896079

Palavras-chave: Cães; CD₄; CD₈; Imunoestimulação; Neonatos; Neonatos caninos.

Ao meu amado companheiro Manoel Henrique
por estar sempre ao meu lado.

Às minhas queridas filhas Carolina, Patrícia e
Cláudia pelo apoio nesses anos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helena Ferreira, pela orientação, inestimável colaboração e incentivo no decorrer desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Flávio Quaresma Moutinho pela disposição ao aceite da orientação quando da aposentadoria da Profa. Helena, pelo carinho e bom humor.

À Profa. Dra. Michiko Sakate pela amizade, simpatia e pelas correções e sugestões desde a fase de realização do Projeto.

À minha amiga Maria Lúcia Gomes Lourenço pela amizade, incentivo, auxílio durante a pesquisa e sugestões.

À Raquel Reis Martins pela amizade, auxílio na contenção dos neonatos em toda a pesquisa e pela realização das análises laboratoriais.

À Veridiana Fernandes da Silveira pela amizade e realização das análises laboratoriais.

À Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira pela supervisão das análises laboratoriais.

À Valéria Alves da Silva e à Marjorie de Assis Golim do Laboratório de Citometria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu, pela simpática acolhida e pelo auxílio na realização das imunofenotipagens.

À hematologista Dra. Maura Rosane Valério Ikoma, pelo auxílio na supervisão e interpretação das quantificações das subpopulações linfocitárias.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Cury pela orientação e realização das análises estatísticas.

À telefonista Cleonice De Piere do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu, pela simpatia no atendimento.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária Nelson Adriano, Izabel Cristina Castro, Luiz Antônio Souza Pinto pela amizade, simpatia e pelas boas conversas.

Às bibliotecárias Luciana Pizzani e Rosemary Cristina da Silva pelo auxílio na correção das referências bibliográficas e à Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.

À Rosângela Aparecida Soares, funcionária do Posto da FAPESP na Biblioteca, pela orientação e simpatia.

Aos amigos Rudson Almeida de Oliveira e Maria do Socorro Pires e Cruz pela amizade, correção e sugestões nesta tese.

À Isaura Pedro Mariano, minha secretária e amiga, pelo trabalho realizado nesses quatro anos junto à minha família e pelo apoio.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados e a todos os meus familiares, pelo apoio, convivência e as horas felizes nesses quatro anos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, após 20 anos que se passaram da graduação, pela oportunidade do retorno e da realização da Pós-Graduação.

Ao Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica da Universidade Federal do Piauí pelo auxílio da bolsa de pesquisa junto a Capes.

Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí pela liberação para esta qualificação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido a esta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente com amizade e palavras de incentivo contribuíram na realização dessa pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A ação imunomoduladora do carotenóide luteína e do vírus inativado *Parapoxvirus ovis* nas subpopulações de linfócitos T (LT) CD4+ e CD8+ do sangue periférico foi pesquisada em neonatos caninos pela técnica de citometria de fluxo. Trinta neonatos, machos e fêmeas, sem raça definida, com três dias de idade, foram separados em três grupos com 10 animais cada. Os animais do Grupo Controle (GC) não receberam tratamento; os do Grupo Luteína (GL), a partir do terceiro dia do nascimento até ao 38º dia de vida, receberam, por via oral, 2,0 mL de solução contendo 20 mg do carotenóide luteína, uma vez ao dia; e os do Grupo Parapoxvirus (GP) foram tratados com a suspensão de *Parapoxvirus ovis* por via subcutânea, na dose de 1,0 mL, do terceiro dia do nascimento até ao 38º dia de vida, uma vez por semana. As avaliações ocorreram aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7. Para a citometria de fluxo, utilizou-se a técnica de lise do sangue total. Na marcação das subpopulações linfocitárias T CD4+ e CD8+ foram utilizados, respectivamente, os anticorpos monoclonais *rat anti-canine CD4* conjugado com o isotiocianato de fluoresceína e *rat anti-canine CD8* conjugado com a ficoeritrina. Nas análises estatísticas entre os grupos GC, GL e GP em cada momento para ambas populações linfocitárias, não houve diferenças significativas, indicando que independente dos tratamentos administrados, os grupos apresentaram o mesmo perfil de resposta. Nas análises entre momentos em cada grupo para LT CD4+ e LT CD8+ diferenças significativas ($p < 0,05$) ocorreram nos três grupos. Nas relações CD4+:CD8+ foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em todos os grupos, somente nas análises entre os momentos. Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, concluiu-se que tanto o carotenóide luteína quanto o *Parapoxvirus ovis* inativado não influenciaram a expressão dos marcadores dos linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico de neonatos caninos, no período em que foi administrado, no entanto, as diferenças semanais nas populações linfocitárias mostraram a dinâmica destas células no período neonatal.

Palavras-chave: cães; CD4; CD8; imunoestimulação; neonatos; neonatos caninos.

ABSTRACT

The immuno-modulatory action of lutein carotenoid and of the *Parapoxvirus ovis* inactivated virus in the lymphocytes subsets of peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ was researched in the canine newborn by the flow cytometry analysis. Thirty puppies, males and females, mixed breeds with three days of age, were separate in three groups with 10 animals each one. The animals of the Control Group (CG), didn't receive treatment; the one of the Lutein Group (LG), since the third day of the birth up to 38^o day of life received, once a day, 2,0 mL of solution containing 20 mg of lutein, and the one of the *Parapoxvirus* Group (PG), was treated with the suspension of *Parapoxvirus ovis* by subcutaneous injection, in the dose of 1,0 mL, of the third day of the birth up to the 38^o day of life, once a week. The evaluations realized to the 3, 10, 17, 24, 31, 38 and 45 days of life, corresponding respectively at M1 to M7 moments. For the flow cytometry, the whole blood lysis technique and to identify CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells simultaneously rat anti-canine CD4 antibody conjugated with the fluorescein isothiocyanate and the rat anti-canine CD8 antibody conjugated with phycoerythrin were used. By the statistical analysis among the groups CG, LG and PG in every moment for both lymphocytes subsets, there were not significant differences, indicating that independent of the kind of treatments, the groups had the same answer profile. In the analysis among moments in each group, for CD4⁺ and CD8⁺ LT, significant differences ($p < 0,05$) occurred in the three groups. Also, to the CD4⁺:CD8⁺ ratio significant differences ($p < 0,05$) occurred only among moments in all groups. This results showed that as lutein carotenoid as *Parapoxvirus ovis* didn't influence the expression of the lymphocytes markers CD4⁺ and CD8⁺ in the peripheral blood of canine newborn, in the period in that it was administered, however, the weekly differences in the lymphocytes subsets populations showed the dynamics of these cells in this period.

Keywords: dogs; CD4; CD8; immunostimulation; newborn; canine newborn.

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO E LITERATURA	1
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local do experimento	17
3.2 Obtenção dos neonatos	17
3.3 Cuidados com os neonatos	18
3.4 Metodologia da pesquisa	20
3.4.1 Grupo Controle (GC)	20
3.4.2 Grupo tratado com Luteína (GL)	20
3.4.3 Grupo tratado com <i>Parapoxvirus ovis</i> (GP)	20
3.5 Preparo dos imunógenos	21
3.5.1 Luteína	21
3.5.2 <i>Parapoxvirus ovis</i>	21
3.6 Anticorpos monoclonais conjugados	23
3.7 Amostras de sangue dos neonatos	24
3.8 Análises laboratoriais	24
3.8.1 Leucogramas	25
3.8.2 Preparo da amostra do sangue periférico para avaliação citométrica	25
3.8.3 Marcação dos linfócitos do sangue periférico canino com anticorpos monoclonais e preparação das amostras	25
3.8.4 Análise em citômetro de fluxo das subpopulações linfocitárias do sangue periférico canino marcadas com anticorpos fluorescentes	26
3.9 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Manejo pré e pós-natal	29
4.2 Evolução dos pesos dos animais	29
4.3 Comportamento dos leucócitos e linfócitos totais	30
4.4 Comportamento dos LT CD4+ e CD8+ e evolução da relação CD4+ e CD8+ (CD4+:CD8+) do sangue periférico	37
5 DISCUSSÃO	49
5.1 Manejo pré e pós-natal	49
5.2 Evolução dos pesos dos animais	51
5.3 Comportamento dos leucócitos e linfócitos totais	52
5.4 Aplicação da técnica de citometria de fluxo, comportamento dos LT CD4+ e CD8+ e evolução da relação CD4+ e CD8+ (CD4+:CD8+) do sangue periférico	52
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

O sistema imune tem como papel principal a proteção do organismo contra a invasão de agentes infecciosos, químicos e outras substâncias antigênicas. A presença de qualquer antígeno pode representar uma ameaça para o organismo e assim, o sistema imune desenvolveu muitos meios para combater esses agentes desafiantes. As evidências de atividade imunológica existem desde a fase fetal, mas muitos dos sistemas acessórios necessários para uma adequada resposta imune, nesta fase, não estão suficientemente desenvolvidos nem funcionais, o que torna o feto altamente susceptível à invasão por microorganismos e às várias doenças que para as mães poderão ser leves ou até inaparentes, mas para os fetos graves ou letais.

As respostas imunológicas nos animais apresentam dois componentes principais, a inata ou inespecífica e a adaptativa ou específica. Na presença dos organismos patogênicos invasores, a imunidade inata é a primeira linha de defesa. A ativação deste sistema, capaz de derrotar os patógenos, envolve uma resposta antígeno não-específica e é constituída principalmente pelas barreiras físicas e bioquímicas dos epitélios e das mucosas, pelas células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), pelas células *natural killer* (NK) e pelos constituintes protéicos sanguíneos, como os componentes do sistema complemento e as citocinas como interferon e as interleucinas (Banks, 1982; Tizard, 2000).

Por outro lado, o sistema imunológico adaptativo é ativado caso as primeiras linhas de defesa sejam ultrapassadas e envolve a geração de uma resposta produzida por linfócitos. Este sistema produz uma reação antígeno-específica, capaz de reconhecer e montar uma resposta imunológica contra os antígenos de origens bacteriana, virais, fúngicos, protozoários e helmintos, proporcionando padrões de resposta celular mediada por linfócitos T (LT), ou resposta humoral mediada por linfócitos B (LB), responsáveis pela produção de anticorpos (Tizard, 2000).

O sistema imunológico adaptativo, mediado por células após a estimulação antigênica, sofre expansão clonal e uma grande população de LT específico ao antígeno é formada. A proliferação de linfócitos é, portanto, um dos pré-requisitos para que o organismo desenvolva uma imunidade funcional. Duas subpopulações distintas, os LT auxiliares e os LT citotóxicos fazem parte da

imunidade celular. Os LT auxiliares desempenham um papel central em promover e regular a resposta imune. Quando um antígeno exógeno processado pelos macrófagos, células dendríticas ou células B é apresentado aos LT auxiliares, estes são ativados e secretam uma variedade de glicoproteínas, as citocinas, as quais são fundamentais na ativação dos LB, dos LT citotóxicos e dos próprios macrófagos. Os LT citotóxicos ativados desempenham uma função vital ao monitorar as células do organismo destruindo antígenos endógenos, como no caso de células infectadas por vírus e células tumorais (Lydyard & Grossi, 1994; Williams, 1997; Tizard, 2000).

No desenvolvimento do sistema imune fetal dos mamíferos, o primeiro órgão linfóide a se desenvolver é o timo. No timo fetal canino, a diferenciação dos linfócitos ocorre entre 23 a 33 dias de gestação e, no 40^o dia os fetos já podem responder a inoculação antigênica (Jacoby et al., 1969). Portanto, o feto não é totalmente indefeso, já que a sua capacidade em responder a estimulação antigênica se desenvolve muito rapidamente após o aparecimento dos órgãos linfóides. Entretanto nesta fase, a capacidade em combater infecções é menor do que os neonatos e adultos, já que nem todos os antígenos são capazes de estimular o tecido linfóide fetal (Jacoby et al., 1969; Jacoby & Griesemer, 1970).

Nos neonatos caninos menores que três semanas de idade, foi demonstrada a competência imunológica a estímulos antigênicos protéicos e virais, pois a quantidade de anticorpos formada é igual a dos adultos; no entanto, os padrões das suas respostas indicaram que a maturidade imunológica pode não ser alcançada nessa fase da vida (Shifrine et al., 1971; Lewis et al., 1973).

Esta imaturidade imunológica foi evidenciada por Gerber & Brown (1974) e Krakowka et al. (1975) em neonatos de zero a quatro semanas de idade que apresentaram uma resposta dos LT *in vitro* ao mitógeno fitohemaglutinina significativamente reduzida quando comparada aos filhotes de seis a 12 semanas de idade; uma resposta deficiente à vacinação (Shifrine et al., 1971; Lewis et al., 1973) e uma suscetibilidade elevada à infecção pelo vírus da cinomose (Krakowka & Koestner, 1976). O fato dos neonatos apresentarem um sistema imune pouco responsivo pode ser atribuído a muitos fatores incluindo diferenças nas subpopulações dos LT e de seus estágios de diferenciação ou fatores supressivos passivamente adquiridos pelo colostro como os anticorpos e a atividade excessiva de LT supressores (Banks, 1982; Poffenbarger et al., 1991). Neste contexto, as pesquisas realizadas para o conhecimento da resposta imune neonatal

demonstraram que o canino recém-nascido apresenta um sistema imune subdesenvolvido que gradualmente amadurece nas primeiras seis a oito semanas de vida (Jacoby et al., 1969; Shifrine et al., 1971; Gerber & Brown, 1974; Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991).

A importância do conhecimento sobre o desenvolvimento pós-natal do sistema imune é indispensável para a avaliação da imunocompetência. Após o nascimento, os neonatos são imediatamente expostos a um ambiente rico em microorganismos. Portanto, podem estar vulneráveis às invasões microbianas, mas a proteção pelos anticorpos maternos adquiridos pelas vias placentária e colostrar, deverá controlá-las em um curto espaço de tempo. O acesso dos neonatos ao colostro nas primeiras 48 horas de vida é indispensável, pois este, além de conter os nutrientes para o crescimento dos filhotes, contém também, os anticorpos, as células e as proteínas específicas que vão desempenhar proteção inicial contra as doenças infecciosas (Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991; Salmon, 1999; Rogers, 2001).

A via pela qual os anticorpos maternos alcançam o feto é determinada pela estrutura da placenta. A placenta das cadelas é do tipo endoteliocorial no qual o epitélio coriônico em contato com o endotélio dos capilares maternos permite a transferência de apenas 5% a 10% de imunoglobulinas, no entanto, a transferência por via colostrar é da ordem de 90% a 95% (Gillete & Filkins, 1966; Chappuis, 1998).

A imunidade colostrar tem relação com o nível de imunidade sistêmica da mãe e a quantidade de imunoglobulinas transferida depende da quantidade de colostro ingerida pelos neonatos (Gillete & Filkins, 1966; Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991; Salmon, 1999; Rogers, 2001). Os níveis máximos de anticorpos séricos nos neonatos são alcançados 36 a 48 horas após o nascimento e serão proporcionais aos anticorpos maternos (Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991; Salmon, 1999; Rogers, 2001). Portanto, a imunidade passiva é determinada pelo nível de imunidade sistêmica da mãe e pela quantidade de colostro ingerida pelo neonato. Este fato proporciona uma imunidade heterogênea entre as ninhadas e entre membros de uma mesma ninhada (Chappuis, 1998).

A função da glândula mamária é a de fornecer ao neonato, durante a fase de amamentação, os nutrientes, os anticorpos, as células e os fatores que deverão agir na proteção contra os agentes infecciosos (Norcross, 1982;

Poffenbarger et al., 1991; Salmon, 1999), e a natureza dinâmica, durante o ciclo lactacional, impõe variações qualitativas e quantitativas das imunoglobulinas (Ig) (Butler, 1973; Watson, 1980).

O colostro contém 1.500 mg de Ig/100 mL na hora do parto e diminui para 200 a 300 mg de Ig/100mL dois dias após o nascimento (Heddle & Rowley, 1975). Possui 80% de IgG e 20% de IgA, porém esta relação se inverte após a primeira semana de lactação (Norcross, 1982). Já a concentração de IgM tanto no colostro como no leite é pequena (Reynolds & Johnson, 1970; Heddle & Rowley, 1975). As imunoglobulinas A e M das secreções lácteas são produzidas na glândula mamária, mas a IgG é transferida principalmente do soro (Norcross, 1982). Há diferença nas concentrações das várias subclasses de imunoglobulinas entre o soro, o colostro e o leite, sugerindo um processo de transporte seletivo (Poffenbarger et al., 1991).

No colostro e no leite estão também presentes um número significativo de LT e LB, macrófagos e células polimorfonucleares que executam a importante função de prevenir e controlar infecções, limitar a multiplicação bacteriana e eliminar os microorganismos da própria glândula (Opdebeecg, 1982; Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991). Estas células absorvidas por via intestinal pelos recém-nascidos podem também auxiliá-los no estabelecimento de uma imunidade celular local (Poffenbarger et al., 1991).

A precocidade da mamada é fundamental para a absorção integral dos anticorpos já que esta é realizada por pinocitose pelas células do intestino delgado do neonato. A absorção dessas proteínas ocorre particularmente no íleo, onde são ativamente transportadas pelas células epiteliais e, passam através destas para os capilares intestinais, alcançando a circulação sistêmica (Simpson-Morgan & Smeaton, 1972). Em geral a permeabilidade intestinal é maior imediatamente após o nascimento e declina após seis horas pelo repovoamento dos enterócitos por uma população de células já sem a habilidade de pinocitose (Chappuis, 1998).

A partir da fase colostral, a continuidade da amamentação exclusivamente com leite materno, nas primeiras três semanas de vida dos neonatos, deve ser vigorosa e ativa. Cada filhote deve mamar em qualidade e quantidade adequadas. Se a mãe é saudável e bem nutrida, as necessidades nutricionais do filhote deverão ser completamente supridas. As indicações de que os filhotes não estão recebendo leite adequadamente, são demonstradas pelo choro

constante, extremas inatividades e/ou pelo insuficiente ganho de peso, segundo os padrões gerais que estipulam este ganho de um a três gramas por dia (Hoskins, 2001a). A transição do leite materno para outro tipo de alimentação, ao se iniciar o desmame, por volta da terceira semana, deve ser gradual, na forma de papa. Quando os filhotes estiverem alimentando bem, deve-se reduzir gradualmente a papa e acrescentar a alimentação sólida especificamente formulada para a fase de crescimento (Hoskins, 2001a).

As pesquisas sobre os valores normais de leucócitos e linfócitos de neonatos caninos são bastante escassas. Earl et al. (1973) verificaram, em neonatos da raça Beagle, a dinâmica da população linfocitária. Na primeira semana de vida, o valor absoluto de linfócito apresentou mais elevado comparado ao primeiro dia de vida. Na segunda semana ocorreu uma leve diminuição, na terceira, os linfócitos voltaram a aumentar e atingiram o maior pico e na quarta voltaram a cair. Jain (1993) e Toman et al. (2002) descreveram na primeira semana de vida em neonatos da mesma raça, uma predominância de linfócitos em relação aos neutrófilos.

Um grande avanço na imunologia possibilitou a caracterização fenotípica das subpopulações linfocitárias, em virtude do conhecimento de que estas células expressam diferentes proteínas em suas superfícies. Entre estas, estão os receptores antigênicos, também denominados de marcadores de superfície, que reconhecem, interagem e respondem aos antígenos. Para definir os grupos de anticorpos similares quanto às reatividades nos locais específicos das células alvo e quanto aos diversos marcadores de superfície, foi criada a nomenclatura CD (*cluster of designation*) que vem acompanhada por algarismos arábicos. Esta nomenclatura sistematizada define em quais células os marcadores de superfície são identificados. Desta forma, a imunofenotipagem em sangue periférico, que visa o isolamento e identificação dos marcadores celulares linfocitários, foi possível graças à tecnologia de citometria de fluxo e aos anticorpos monoclonais fluorescentes (Williams, 1997).

Estes anticorpos específicos são direcionados contra os marcadores de células T e permitem que sejam realizadas as medidas das populações celulares, proporcionando a identificação e a quantificação dos marcadores de superfície, como o CD4⁺ e o CD8⁺, presentes nas subpopulações linfocitárias T auxiliares e T citotóxicas, respectivamente (Williams, 1997; Weiss, 2002). Para Quirke & Dysin (1986) e Colvin & Preffer (1987), a citometria de fluxo é um método de detecção para as células envolvidas nas respostas imunológicas visto ser uma técnica que

apresenta qualidades como rapidez na determinação, capacidade quantitativa, sensibilidade e precisão estatística.

O aparelho que realiza a citometria faz a leitura das células dispersas em solução após serem coradas com os fluorocromos apropriados. Portanto, numa suspensão de células submetida a uma mistura simultânea com anticorpos monoclonais marcados com dois fluorocromos contra os LT CD4⁺ e CD8⁺, o reconhecimento será apenas das células que carregam os antígenos apropriados. Estas células são orientadas em um fluxo tubular e interceptadas, uma a uma, por um feixe de luz, geralmente raio laser que realiza a separação e a contagem das células com base no tamanho e intensidade da fluorescência. Os fluorocromos, isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e ficoeritrina-R (RPE, do inglês *R-phycoerythrin*), que emitem fluorescência verde e alaranjada, respectivamente, são os mais empregados (Szer et al., 1985; Landay et al., 1991; Gebhard & Carter, 1992). A luz dispersada é coletada por um sistema óptico composto de lentes e espelhos divididos em vários componentes, no caso de mais de um corante ser utilizado. Por meio de detectores, os componentes fluorescentes são convertidos em sinais eletrônicos, que são processados adequadamente por programas computacionais (softwares) específicos para esse fim e transformados em dados para armazenamento e análise (Melamed et al., 1990; Ormerod, 1994).

No preparo das amostras para imunofenotipagem, a meta é manter todos os componentes celulares como estes se encontram *in vivo*. É importante e ideal que as subpopulações linfocitárias T CD4⁺ e CD8⁺ sejam preservadas, enquanto outros componentes que possam interferir na identificação desses linfócitos sejam eliminados. O método de separação de células linfocitárias, por diferença de gradiente de densidade pelo Ficoll ou Histopaque, que também foi empregado no cão, apresenta o inconveniente por requerer um volume maior de sangue e proporcionar maiores alterações nas subpopulações linfocitárias (Boyum, 1964; Greeley et al., 1996; Strasser et al., 1998; Byrne et al., 2000; Kim et al., 2000a, b).

Dessa forma, o método recomendado para o isolamento de linfócitos nas amostras de sangue, segundo as diretrizes da *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, é a lise do sangue total (Paxton et al., 1989), que já foi utilizado nas análises imunofenotípicas das subpopulações T em gatos (Dean et al., 1991;

Davidson et al., 1993; Sellon et al., 1996; Byrne et al., 2000) e em cães (Byrne et al., 2000; Faldyna et al., 2001; Toman et al., 2002). Para Faldyna et al. (2001), no isolamento de linfócitos da amostra, deve-se dar preferência à técnica da lise do sangue total. Nesta técnica, o volume de sangue necessário é bem menor em comparação ao método de separação de células linfocitárias por diferença de gradiente de densidade e, a obtenção de um volume maior de sangue, pode estar dificultada, freqüentemente, em relação ao porte corpóreo do paciente ou pelo seu estado de saúde.

Nas colheitas das amostras de sangue para citometria de fluxo, o anticoagulante recomendado é o ácido etilenodiaminotetracético a 10% (EDTA), que apresenta vantagens sobre os demais, porque proporciona uma boa separação das distintas populações leucocitárias e permite que as amostras possam ser analisadas satisfatoriamente dentro de um período de 24 horas. Para reduzir variabilidade entre amostras, as contagens total e diferencial dos leucócitos e a análise dos marcadores celulares devem ser realizadas na mesma amostra (Paxton et al., 1989). É importante também, que as amostras sejam colhidas pela manhã, para evitar que as contagens de linfócitos totais sofram com os efeitos das variações diárias (Malone et al., 1990). Quanto ao transporte e à estocagem das amostras para o laboratório, estes devem ser realizados imediatamente, sob uma temperatura de 22 °C e assim permanecer até que as análises sejam iniciadas. Estes procedimentos são importantes para a preservação do LT auxiliares (Weiblen et al., 1983).

Nas pesquisas que envolvem o ser humano, a imunofenotipagem tem sido utilizada para caracterizar o sistema imune em indivíduos normais como nos portadores de enfermidades, principalmente na síndrome da imunodeficiência adquirida, na leucemia, no linfoma, na identificação de imunodeficiências, na monitoração da evolução e no auxílio ao prognóstico (Byrne et al., 2000). Em Medicina Veterinária, a imunofenotipagem além de possibilitar o conhecimento da distribuição das subpopulações de linfócitos em animais normais, também é empregada como meio de diagnóstico nas diversas enfermidades onde o sistema imune está envolvido. Especificamente em cães, a imunofenotipagem foi utilizada para caracterizar a resposta imunológica em enfermidades como na artrite reumatóide (May et al., 1992), no lúpus eritematoso sistêmico (Chabanne et al., 1995a), na piodermatite dos cães Pastores Alemães (Chabanne et al., 1995b), na

demodicose (Caswell et al., 1997), na leishmaniose (Bourdoiseau et al., 1997) e na dermatite atópica (Sinke et al., 1997).

As pesquisas com imunofenotipagem realizadas em seres humanos e em roedores, para o conhecimento da influência da idade nas distribuições das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, permitiram demonstrar uma relação entre o declínio da resposta imunológica, a involução do timo e o envelhecimento. Este declínio, que parece envolver uma depressão das atividades dos LT auxiliares, foi demonstrado tanto na ocorrência da diminuição da resposta proliferativa a mitógenos, como na produção e na expressão de receptores para IL-2 (Makinoden & Kay, 1980; Gillis et al., 1981; Murasko et al., 1987; Thoman & Weigle, 1989; Beckman et al., 1991; Song et al., 1993). Em gatos e em cães, a imunofenotipagem tem sido também utilizada com a finalidade de caracterizar a influência da idade nas distribuições das subpopulações de LT.

A diminuição dos percentuais de LT CD4⁺, CD8⁺ e da relação CD4⁺:CD8⁺, em gatos após um ano de idade, foram demonstradas por George et al. (1993) e English et al. (1994).

Em neonatos felinos, até oito semanas de idade, foi demonstrada a manutenção da relação CD4⁺:CD8⁺ durante todo o período analisado, com aumento significativo de LT CD8⁺ na oitava semana (Sellon et al., 1996).

A pesquisa de Greeley et al. (1996) em cães na faixa etária entre nove meses a 11 anos e seis meses, demonstrou a ocorrência de aumentos significativos nas porcentagens de LT CD8⁺, diminuição de LT CD4⁺ e da relação CD4⁺:CD8⁺, conforme o envelhecimento dos animais.

Na quantificação dos linfócitos sanguíneos de cadelas da raça Beagle com 18 meses de idade, os valores encontrados foram 45,0% e 28,8%, para LT CD4⁺ e LT CD8⁺, respectivamente, sendo a relação CD4⁺:CD8⁺ de 1,87. Os valores para grupos de cães mestiços, machos e fêmeas, na faixa etária entre três anos e quatro meses a quatro anos foram também determinados (CD4⁺, 41,7%; CD8⁺, 28,6% e a relação CD4⁺:CD8⁺ de 1,74) e para cães das raças Labrador e Terrier, estes valores foram determinados para machos e fêmeas, com idades médias entre dois (CD4⁺ 45,1%; CD8⁺ 17% e relação CD4⁺:CD8⁺ 3,17) e nove anos (CD4⁺ 30,9%; CD8⁺ 18,9% e relação CD4⁺:CD8⁺ de 2,21) (Byrne et al., 2000).

A distribuição das subpopulações de linfócitos do sangue periférico em seis neonatos caninos da raça Beagle de cinco a seis dias de vida mostrou valores percentuais de $45,6 \pm 7,9$ para os LT CD4+ e $7,7 \pm 3,4$ para os LT CD8+. A relação CD4+:CD8+ foi $7,0 \pm 3,3$. Aos dois e seis meses de idade nenhuma mudança ocorreu nos percentuais dos LT CD4+, porém, os LT CD8+ aumentaram com o avançar da idade e como consequência a relação CD4+:CD8+ diminuiu. Os resultados da pesquisa também indicaram diferenças nas faixas etárias entre seis meses e um a dois anos, principalmente quanto ao aumento da população de LT CD8+ e diminuição da relação CD4+:CD8+. Nenhuma diferença nas populações linfocitárias foi observada nos animais do grupo da faixa etária entre um a dois anos comparados ao grupo entre três a cinco anos de idade. Quanto à distribuição das subpopulações linfocitárias nas raças Beagle, Pastor Alemão, Dálmata e Dachshund na faixa etária entre um a cinco anos, a raça Pastor Alemão apresentou a mais alta relação CD4+:CD8+, enquanto que a raça Dálmata apresentou a mais baixa. (Faldyna et al., 2001).

A quantificação dos marcadores de superfície dos linfócitos em três neonatos caninos da raça Beagle com um dia de vida revelou percentuais de $36,9 \pm 5,2$ e $2,7 \pm 0,4$ para LT CD4+ e CD8+, respectivamente. A partir da primeira até a quarta semanas, em dez neonatos, obtiveram valores percentuais de $48,8 \pm 8,0$ e $5,9 \pm 3,6$; $42,3 \pm 6,8$ e $9,5 \pm 2,3$; $35,6 \pm 9,5$ e $13,8 \pm 2,5$ e, $42,1 \pm 6,3$ e $10,1 \pm 3,6$ para LT CD4+ e CD8+, respectivamente. Quando estas populações linfocitárias foram quantificadas em cães de dois a quatro meses de vida, ficou demonstrado que estes animais apresentaram valores semelhantes a cães adultos na faixa etária entre um a dois anos (Toman et al., 2002).

A capacidade de regular ou modular artificialmente uma resposta imunológica em qualquer fase da vida do animal ou diante de uma enfermidade, pode ser obtida pelo emprego das substâncias imunomoduladoras, que apresentam a propriedade de aumentar (imunoestimulação) ou suprimir (imunossupressão) a resposta imune (BLECHA, 1988). A atividade imunoestimulante pode ser produzida por uma ampla variedade de substâncias produzidas a partir de bactérias atenuadas, carboidratos complexos, antihelmínticos, hormônios tímicos, vitaminas, citocinas e vírus inativados (Taura et al., 1995; Tizard, 2000).

No Brasil, encontrava-se no comércio, até bem pouco tempo, um fármaco denominado Baypamun¹, produzido especificamente para a Medicina Veterinária, que utiliza a cepa viral inativada D1701 de *Parapoxvirus ovis*. O *Parapoxvirus* foi isolado de um carneiro que sofria de dermatite pustular, em seguida atenuado após mais de 200 passagens em cultura de células ovinas e bovinas e inativado com beta-propiolactona (Büttner et al., 1987 apud Bayer, 1996; Strube et al., 1989 apud Bayer, 1996).

As pesquisas realizadas na avaliação dos mecanismos de ação do *Parapoxvirus* inativado na resposta imune mostraram que seu efeito ocorre no aumento da imunidade inata ou inespecífica e os termos paraimunidade e indutor de paraimunidade foram as denominações respectivas empregadas para o aumento da imunidade inespecífica e para o fármaco que acarreta este estado (Mayr, 1978 apud Bayer, 1996; Mayr & Büttner, 1984 apud Bayer, 1996; Büttner, 1993, 1994).

Segundo Mayr (1981) apud Bayer (1996), a ativação dos sistemas que compõem a paraimunidade pode ser proporcionada naturalmente, por meio do contato com o antígeno, ou artificialmente pela administração dos indutores de paraimunidade. O aumento das atividades dos componentes do sistema imune após a paraimunização foi comprovado pela estimulação da atividade das células NK. Estas fazem parte da subpopulação de células T e, contêm numerosos grânulos citoplasmáticos capazes de lisar células tumorais e células infectadas por vírus, pelo aumento da atividade fagocitária de neutrófilos, macrófagos e pela produção das citocinas, IL-2 e interferon (Böttcher, 1994; Kretzdorn et al., 1994). O procedimento de paraimunização inicia-se com a interação das partículas virais com os mecanismos de defesa inespecíficos, onde estes não necessitam de receptores especiais para permitir a entrada nas células, mas o fazem pelo processamento intracelular em células permissivas (Moss, 1991).

De modo geral, a ação do *P. ovis* no organismo animal é a de promover a mobilização das células de defesa da medula óssea, dos linfonodos e do sistema reticular, conduzindo à ativação das defesas que se inicia em algumas horas e persiste por dias. O seu uso tem indicação na profilaxia das infecções induzidas

¹ Baypamun[®] DC – Bayer S. A.- Produto importado. Retirado do comércio Nacional, por determinação da Matriz Alemã, em abril/2003.

por estresse, nas infecções durante o período neonatal e como adjuvante no tratamento das doenças infecciosas (Bayer, 1996).

Segundo o fabricante, o *P. ovis* não apresenta efeitos colaterais e o estado de estimulação do sistema imune permanece por até oito dias podendo o paciente ser novamente estimulado. Sua apresentação é na forma liofilizada e após ser incorporada ao diluente apropriado pode ser aplicada por via subcutânea ou intramuscular, na dose de 1,0 mL, independente do peso, sexo ou idade. Cada dose apresenta 106,45 de TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose*) e os principais componentes estimuladores das partículas do *Parapoxvirus* estão localizados no envelope dos vírions (Büttner, 1993; Bayer, 1996).

Na terapia de tumores mamários em cadelas, Berg & Rüsse (1994) apud Bayer (1996) demonstraram que a cirurgia e a continuidade da terapia com o indutor de paraimunidade produziram melhores resultados do que a terapia somente com a cirurgia ou com a paraimunização. Nas respostas imunológicas e clínicas de cães de oito a 12 semanas de idade após o desafio viral com a cepa virulenta *Manhattan* do adenovírus tipo 2, 100% dos animais submetidos à terapia paraimunomodulatória recuperaram-se da infecção enquanto que somente 50% dos animais controles ficaram livres dos sinais clínicos (Hennessy et al., 1994).

Para determinar a eficácia terapêutica do indutor de paraimunidade, dois experimentos controlados duplo-cego foram realizados em gatos naturalmente infectados pelo vírus da leucemia felina (VLF). No primeiro estudo, 60 gatos foram tratados com *P. ovis* por um período de sete semanas e 60 receberam placebo no mesmo período. Sete gatos (11,7%) tratados e quatro (6,7%) que receberam placebo converteram a sorologia (conversão de VLF-positivo para VLF-negativo), mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Os estados clínicos dos animais tratados e dos não tratados melhoraram respectivamente em 47% e 33%. No segundo estudo, 15 gatos foram tratados com *P. ovis* e 15 não. A conversão da viremia ocorreu em dois gatos de cada grupo (15,4%). As contagens relativa e absoluta de LT CD4+, CD8+ e a relação CD4+:CD8+ que foram realizadas apenas neste segundo estudo, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos. Portanto, os parâmetros imunológicos, clínicos, laboratoriais e virológicos entre os animais tratados com a droga e os tratados com placebo, nos dois estudos citados, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas,

demonstrando que a infecção pelo VLF não foi influenciada pelo uso do indutor de paraimunidade (Hartmann et al., 1998).

As pesquisas realizadas sobre modulação da resposta imunológica em animais têm demonstrado que os carotenóides ou carotenos também atuam como imunoestimulantes. Os carotenóides são um importante grupo de pigmentos naturais lipossolúveis que absorvem luz e conferem coloração amarela, laranja e/ou vermelha aos vegetais e às algumas frutas. O β caroteno é conhecido por sua atividade pró-vitamina A e no intestino delgado é convertido pela ação de enzimas dioxigenase em vitamina A (Moore, 1930; Parker, 1989, 1996). A vitamina A é essencial para a manutenção normal da visão, para o desenvolvimento dos ossos e dos dentes; para diferenciação, proliferação e reprodução celular, e para a integridade do sistema imunológico (Olson, 1994). Entretanto, carotenóides como a luteína, zeaxantina, licopeno, cantaxantina e outros que não possuem atividade pró-vitamina A têm despertado um enorme interesse dos pesquisadores por também apresentarem efeitos imunoestimulantes.

Os carotenóides α e β caroteno, o licopeno, a criptoxantina, a luteína e a zeaxantina, identificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, estão entre os carotenóides mais comuns encontrados no sangue humano, e a luteína, é o principal (Parker, 1989; Epler et al., 1992,1993).

No ano em que Moore (1930) demonstrava que o β caroteno era o precursor da vitamina A nos animais, as pesquisas de Green & Mellanby (1930) confirmavam que ratos deficientes em vitamina A e suplementados na dieta poderiam vencer infecções bacterianas quando comparados com ratos não suplementados. Clausen (1931) suplementou a dieta de crianças com carotenóides e conseguiu reduzir a gravidade e o número de crianças com infecções respiratórias. Estas pesquisas sugeriam que a atividade pró-vitamina A do β caroteno seria responsável pelo mecanismo anti-infeccioso e pelo aumento da função imunológica.

No entanto, Lingen et al. (1959) descobriram que o licopeno, que não possui atividade pró-vitamina A, apresentava atividade anti-infecciosa, por prolongar a sobrevivência de camundongos com infecções bacterianas. Bendich & Shapiro (1986) demonstraram que ratos alimentados com dieta contendo cantaxantina, carotenóide não pró-vitamina A, apresentaram aumentos consistentes na atividade proliferativa, *in vitro*, dos linfócitos T e B a mitógenos e que a cantaxantina, como o β

caroteno, possuía a habilidade de ser antioxidante, efeito independente da atividade pró-vitamina A. Martin et al. (1996) também demonstraram que a luteína protege células hepáticas contra as lesões induzidas pela oxidação na peroxidação lipídica.

Os estudos sobre as atividades modulatórias dos carotenóides passaram a demonstrar que essas ações não eram proporcionadas pela atividade pró-vitamina A, mas sim pelo efeito antioxidante, que desativa os radicais livres, protege a integridade celular contra seus efeitos deletérios e regula a função imunológica celular (Burton & Ingold, 1984; Bendich & Shapiro, 1986; Burton, 1989; Krinsky, 1989; Canfield et al., 1992; Jyonouchi et al., 1995; Chew, 1995; Chew et al., 1996; Okai & Higashi-Okai, 1996).

Durante o curso normal do metabolismo celular aeróbico, na exposição a radiações ionizantes, na administração de diferentes tipos de substâncias químicas, inclusive fármacos, são continuamente produzidas algumas espécies de oxigênio reativo como o radical ânion superperóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxilo e o oxigênio molecular *singlet*. Estes elementos denominados de radicais livres caracterizam-se por apresentarem elétrons não pareados na órbita externa, serem altamente instáveis e se multiplicarem rapidamente na procura de pareamento. Para tanto, desestabilizam outras moléculas que necessitam ceder seus elétrons. Estas doações que são denominadas bioquimicamente de reações de oxi-redução, se não forem eliminadas, lesam as células e proporcionam prejuízos ao DNA, às proteínas, aos carboidratos e aos lipídeos, além de terem ação imunossupressora. Entretanto, considerando o ser vivo e a importância do oxigênio na manutenção do funcionamento normal adequado da vida, considera-se que os radicais livres mais nocivos são os que provêm do metabolismo do oxigênio (Lunec et al., 1981).

Embora o próprio organismo produza enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que catalizam as reações e previnem os efeitos nocivos das oxidações, essas podem não ser tão abundantes ou foram consumidas rapidamente nas reações. Portanto, a manutenção de uma dieta com antioxidantes é desejável, e os carotenóides por atuar na estabilização dos radicais livres altamente reativos, mantêm, a integridade funcional e estrutural da célula (Di Mascio et al., 1991; Canfield et al., 1992; Thurnham, 1994).

Os estudos iniciais relativos à absorção dos carotenóides indicavam nenhuma (Ahmad, 1931) ou pouca absorção pelos carnívoros (Baker et al., 1986).

Porém, pesquisas mais recentes demonstraram que cães e gatos podem absorver diferentes concentrações de β caroteno (Chew et al., 1997; Weng et al., 1997) e luteína (Chew et al., 1997; Cervený et al., 1998; Park et al., 1999; Kim et al., 2000 a e b) suplementadas na dieta e que as concentrações plasmáticas de ambos carotenóides em cães são dose-dependentes (Weng et al., 1997; Cervený et al., 1998) e gatos (Chew et al., 1997; Chew et al., 1998).

O papel dos carotenóides sobre a modulação das respostas imunológicas foi demonstrado tanto em seres humanos (Alexander et al., 1985; Watson et al., 1991; Hoskinson et al., 1992; Michal et al., 1994; Moriguchi et al., 1996; Mayne, 1996; Burri, 1997) como em animais (Bendich & Shapiro, 1986; Prabhala et al., 1991; Chew, 1995; Chew et al., 1996; Chew et al., 1997; Weng et al., 1997).

O carotenóide luteína pode ser obtido de extratos de flores de *Tagetes erecta* e apresenta-se como um pó amarelo a laranja. Tem despertado o interesse dos pesquisadores, por ter demonstrado que em seres humanos, a sua absorção é mais eficiente do que o β caroteno (Gartner et al., 1996), além de possuir maior eficácia em inibir a auto-oxidação de lipídios (Zhang et al., 1991), como também a proteção das lesões celulares induzidas pela oxidação (Martin et al., 1996).

Os estudos realizados a respeito da cinética da captação da luteína em cães e gatos também demonstraram que após a luteína suplementada na dieta ser absorvida, ocorre a sua captação pelas organelas subcelulares (núcleo, mitocôndrias, microssomas e citosol) dos linfócitos e neutrófilos. No entanto, o mecanismo de ação da luteína como imunomodulador não foi ainda compreendido (Cervený et al., 1998; Park et al., 1999).

Em animais as pesquisas que utilizaram a suplementação da dieta com o carotenóide luteína proporcionaram resultados bastante interessantes. Em camundongos a luteína aumentou a produção de anticorpos em resposta a antígenos dependentes de linfócitos T (Jyonouchi et al., 1995), inibiu o crescimento de tumor de mama (Chew et al., 1996; Park et al., 1998) e estimulou a proliferação de linfócitos *in vitro* em resposta a fitohemaglutinina (Chew et al., 1996).

Em grupos de gatos com 10 meses de idade, as suplementações diárias na dieta de 1, 5 e 10 mg de luteína por 12 semanas, mostraram a ação moduladora do caroteno nas respostas imunes celular e humoral quando comparada ao grupo não suplementado. A luteína foi detectada no plasma após a segunda

semana e a concentração plasmática foi dose-dependente. Após quatro semanas de suplementação ocorreu aumento da resposta proliferativa de linfócitos periféricos *in vitro* aos mitógenos concanavalina A e *pokeweed*. A quantificação da subpopulação de linfócitos em gatos suplementados mostrou aumento significativo na porcentagem de LT CD4+ na 12^a semana, indicando que a luteína modulou a expressão desse marcador de superfície, porém não apresentou efeito significativo sobre LT CD8+ (Kim et al., 2000 a).

Em grupos de cães da raça Beagle, na faixa etária entre 17 a 18 meses suplementados diariamente com 5, 10 ou 20 mg de luteína durante 12 semanas foi verificado que, após a segunda semana a luteína já era detectada no plasma e a sua concentração plasmática era dose-dependente. Nos parâmetros imunológicos mensurados foi demonstrada, após quatro semanas nos grupos suplementados, a proliferação de linfócitos periféricos *in vitro* aos mitógenos fitohemaglutinina, concanavalina A e *pokeweed* em comparação ao grupo não tratado. Um aumento acentuado na proliferação de linfócitos nos animais suplementados com 20 mg de luteína ocorreu na 12^a semana. A resposta de hipersensibilidade tardia após a injeção intradérmica da fitohemaglutinina e de uma vacina polivalente ocorreu com seis e 12 semanas de suplementação e foi dose-dependente. Todos os grupos suplementados apresentaram uma resposta maior a fitohemaglutinina na 12^a semana. Na quantificação das subpopulações dos LT, entre a oitava e 12^a semana, os grupos suplementados mostraram elevadas porcentagens de linfócitos que expressam CD4+ e CD8+ diretamente relacionadas com a maior concentração de luteína na dieta, sendo que os marcadores CD4+ foram os mais expressivos (Kim et al., 2000 b).

Conforme os trabalhos consultados na literatura, a terapia imunoestimulatória é desejável em qualquer fase da vida do animal, entretanto, não foram encontrados até o presente momento, dados sobre a ação desses agentes em neonatos caninos.

2 OBJETIVOS

Utilizando grupos de neonatos caninos, sem raça definida, clinicamente saudável, a partir de três até 45 dias de idade, tratados com o carotenóide luteína e o *Parapoxvirus ovis* inativado, esta pesquisa teve como objetivos:

- a) acompanhar o desenvolvimento dos neonatos, com vistas a possíveis efeitos no desempenho;
- b) verificar, um possível efeito modulatório sobre a resposta imune celular-mediada demonstrada pela quantificação das subpopulações de LT CD4+ e CD8+ no sangue periférico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

A pesquisa foi desenvolvida no Setor do canil-maternidade da Pós-Graduação, do Serviço de Clínica de Pequenos Animais e no Laboratório de Patologia Clínica, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

Para as avaliações das imunofenotipagens das subpopulações de LT CD4⁺ e CD8⁺ foi utilizado o Laboratório de Citometria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu.

3.2 Obtenção dos neonatos

Foram utilizadas cinco cadelas adultas gestantes, sem raça definida, de porte médio, pesando entre 15 a 20 kg, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu. Os períodos gestacionais foram confirmados com exames ultra-sonográficos realizados no Departamento de Reprodução da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu.

As cadelas foram mantidas em jaulas individuais no canil-maternidade com fornecimento de ração comercial¹, duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Duas vezes ao dia foram realizados passeios ao ar livre com as cadelas contidas em coleiras e acompanhadas. O estado de higidez das cadelas foi verificado semanalmente, por meio de exames físicos segundo McCurnin & Poffenbarger (1991). Na primeira semana da aquisição das gestantes foram colhidos materiais para a realização de hemograma, urinálise, parasitológico de fezes e para exame sorológico de toxoplasmose, leptospirose e brucelose. Aproximadamente 15 dias da data prevista ao parto, novamente foram realizados hemograma, urinálise e parasitológico de fezes.

¹ Pedigree® Júnior- Waltham.

As cadelas foram submetidas ao tratamento anti-helmíntico, de amplo espectro¹, na dose única de 100 mg/kg de peso de fenbendazole e 5 mg/kg de peso de praziquantel aos 30, 55 dias de gestação e 21 dias após o parto. Foi aplicada uma dose de vacina² contra parvovirose, cinomose, hepatite infecciosa, leptospirose, coronavirose e parainfluenza aos 45 dias de gestação.

Próximo ao dia previsto do parto, para a acomodação dos filhotes, foram preparadas as caixas-maternidades. Estas foram confeccionadas de material plástico e com dimensões baseadas no porte das cadelas. A largura de 65 cm por 1 m de comprimento e 30 cm de profundidade, visou evitar a queda dos neonatos, sem, contudo dificultar a entrada e a saída da mãe. Nestas condições houve espaço suficiente para que a parturiente aquecesse e amamentasse seus filhotes com comodidade, evitando-se a dispersão indesejável dos neonatos e traumas por pisoteio ou esmagamento destes por parte da cadela. As caixas foram forradas com cobertor visto ser este material confortável e promover o aquecimento da mãe e dos neonatos nas primeiras três semanas de vida. Os cobertores eram trocados diariamente e devidamente lavados e higienizados. No assoalho do canil foi colocado um tablado de madeira com a finalidade de isolante térmico, uma vez que as jaulas foram confeccionadas com cimento. No inverno, principalmente no período noturno, era mantido no canil-maternidade, um aparelho aquecedor.

3.3 Cuidados com os neonatos

Todos os animais, a partir do terceiro dia de vida até o décimo dia, foram submetidos ao exame físico neonatal indicado por Breasile (1978) e McCurnin & Poffenbarger (1991) e posteriormente, uma vez por semana, até completarem 45 dias de idade. O acompanhamento do desenvolvimento dos neonatos quanto ao ganho de peso, por meio de pesagem, foi realizado do terceiro ao décimo dia do nascimento e após, semanalmente até 31 dias de vida. Do nascimento até o 25^o dia de vida, os filhotes foram mantidos em companhia de suas respectivas mães nas caixas-maternidades (Figura 1).

¹ Panacur® plus comprimidos - Hoechst Roussel Vet.

² Recombitek® C6/CV – Merial.



Figura 1- Caixa-maternidade. Cadela amamentando seus filhotes, com 24 dias de vida.

A amamentação exclusivamente materna foi realizada até o 20^o dia de vida. A partir do 21^o dia de idade, foi iniciado o desmame com uma dieta pastosa à base de leite desnatado¹ e farináceo² fornecida três vezes ao dia (Hoskins, 2001a). Neste mesmo dia, os filhotes receberam por via oral, o anti-helmíntico fenbendazole³, na dose de 50 mg/kg, uma vez ao dia durante três dias consecutivos.

Aos 28 dias de vida foi iniciado a alimentação com leite desnatado e ração comercial para filhotes em crescimento⁴ intercalados com as mamadas. Aos 35 dias de vida, completamente desmamados e separados de suas mães passaram a receber apenas a ração para filhotes em crescimento, oferecida quatro vezes ao dia.

¹ Italac – Leite UHT desnatado. Usina de Beneficiamento Goiasminas. Indústria de Laticínios Ltda. – Corumbáiba, GO.

² Farinha Láctea Nestlé – Fábrica de Laticínios – São José do Rio Pardo, SP.

³ Panacur®comprimidos – Hoechst Roussel Vet.

⁴ Pedigree® Júnior – Waltham.

3.4 Metodologia da pesquisa

Todos os neonatos selecionados para este trabalho tiveram as mesmas condições de manejo. Durante o experimento, estes permaneceram com suas respectivas mães e receberam todos os cuidados de acomodação já referidos.

Ao todo foram utilizados trinta neonatos, compreendendo 14 machos e 16 fêmeas, provenientes de cinco cadelas, separados por meio de sorteio em três grupos experimentais a partir do terceiro dia de vida e manipulados no decorrer do experimento, até 45 dias de vida. Os animais de cada grupo foram identificados com um bracelete confeccionado com esparadrapo fixado na região do pulso, substituído quando necessário. Os grupos foram formados como se segue:

3.4.1 Grupo Controle (GC)

Foram utilizados 10 filhotes que não receberam nenhum tratamento.

3.4.2 Grupo tratado com Luteína (GL)

10 filhotes receberam, por via oral, 2 mL de solução oleosa com 20 mg de luteína¹, uma vez ao dia, administradas com auxílio de uma seringa, no período da manhã a partir do terceiro dia do nascimento até o 38^o dia de vida (Figura 2).

3.4.3 Grupo tratado com *Parapoxvirus ovis* (GP)

10 filhotes foram tratados com a suspensão contendo *Parapoxvirus*², por via subcutânea, na dose de 1 mL, uma vez por semana, no período da manhã, a partir do terceiro dia do nascimento até o 38^o dia de vida.

¹ PhD Farmácia de Manipulação – Rio de Janeiro.

² Baypamun® DC – Bayer, Saúde Animal. Retirado do comércio nacional, por determinação da matriz alemã em abril de 2003.



Figura 2- Administração de 2 mL de luteína para neonato com 10 dias de vida.

3.5 Preparo dos imunógenos

3.5.1 Luteína

O carotenóide luteína (Figura 3) adquirido encontrava-se na concentração de 1g/100mL de óleo de milho, acondicionado em frasco de cor âmbar, em temperatura ambiente. No Anexo 1 está apresentado o certificado de análise de onde foi adquirido a matéria-prima pelo revendedor.

3.5.2 *Parapoxvirus ovis*

Este produto de uso exclusivo veterinário é apresentado em dois frascos que contêm respectivamente, a forma liofilizada e 1 mL de diluente. Os frascos foram conservados em temperatura de 2 °C a 8 °C e o liofilizado foi diluído no momento da aplicação (Figura 4).



Figura 3- Frascos da cor âmbar contendo 1g de luteína em 100mL de óleo de milho.



Figura 4- Frascos contendo *Parapoxvirus ovis* sob a forma liofilizada (frasco de tampa amarela) e 1 mL de diluente (frasco de tampa branca).

3.6 Anticorpos monoclonais conjugados

Os anticorpos monoclonais caninos para LT CD4⁺ e CD8⁺ e os controles são conjugados com os fluorocromos, FITC que emite luz verde com um pico de emissão de 520 nanômetros (nm) e RPE que emite luz alaranjada com um pico de emissão de 580 nm. Para as quantificações dos LT CD4⁺ e CD8⁺ foram usados, respectivamente, os testes¹ *rat anti-canine CD4/FITC* na concentração de 0,1 mg/mL de IgG diluído para uso e o *rat anti-canine CD8/RPE* que se apresenta liofilizado e foi reconstituído com 1 mL de água destilada (Figura 5). Os controles negativos¹ (isotipos) utilizados foram o *rat IgG2a negative control/FITC* diluído para uso, na concentração de 10mg/mL de IgG e o *rat IgG1 isotype control/RPE* liofilizado que foi reconstituído com 1 mL de água destilada. Os frascos foram conservados em temperatura de 2 °C a 8 °C.



Figura 5- Frascos dos anticorpos monoclonais *rat anti-canine CD4/FITC*, *rat anti-canine CD8/RPE* e respectivos controles negativos.

¹ Serotec Ltda. Kidlington, Oxford – Mega Comercial Científica Ltda, Botucatu, SP, Brasil.

3.7 Amostras de sangue dos neonatos

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida dos neonatos, correspondendo aos momentos 1 a 7 (M1 a M7), com agulha 25x7 e seringas plásticas descartáveis de 3 mL, após tricotomia e antisepsia do local com álcool iodado (Figura 6) e colocadas em frascos identificados contendo o anticoagulante ácido etilenodiamonotetracético (EDTA)¹ a 10% (Paxton et al., 1989). Todas as amostras foram colhidas pela manhã para eliminar os efeitos da variação diurna (Malone et al., 1990).

3.8 Análises laboratoriais

As amostras de sangue, logo após as colheitas, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica para a realização do leucograma e, a seguir, para o Laboratório de Citometria de fluxo para as determinações das imunofenotipagens das subpopulações linfocitárias T.



Figura 6- Colheita de amostra da veia jugular de neonato canino.

¹ EDTA sal tetrassódico, INLAB, INTERMAT, SP.

3.8.1 Leucogramas

As contagens de leucócitos totais foram realizadas no contador eletrônico de células¹. As contagens de linfócitos foram realizadas em esfregaços sangüíneos corados pelo Panótico².

3.8.2 Preparo da amostra do sangue periférico para avaliação citométrica

Para análise em aparelho de citometria de fluxo, a concentração de leucócitos da amostra do sangue deve estar entre 5.000 a 10.000 leucócitos/ μ L. Assim, eventualmente foi necessária a realização da diluição do sangue total para padronizar a relação entre a concentração de leucócitos na amostra e o volume de anticorpos monoclonais a ser utilizado. Para este procedimento, utilizou-se como diluente, a solução isotônica isenta de azida³, na proporção de 1:1 e a seguir, procedia-se a recontagem de leucócitos em câmara de Newbauer, segundo a técnica descrita por Jain (1986).

3.8.3 Marcação dos linfócitos do sangue periférico canino com anticorpos monoclonais e preparação das amostras

Para cada amostra de sangue total ou diluído, um tubo foi identificado para análises conjuntas das subpopulações (dupla-marcação) T CD4+ e CD8+ e outro tubo para os controles negativos. Nos tubos controles foram pipetados 100 μ L de sangue total, 10 μ L de *rat IgG2a negative control* conjugado com FITC e 10 μ L de *rat IgG1 isotype control* conjugado com RPE. Nos tubos testes foram pipetados 100 μ L de sangue total, 10 μ L de *rat anti-canine* CD4+ conjugado com FITC e 10 μ L de *rat anti-canine* CD8+ conjugado com RPE. Os tubos com as amostras foram homogeneizados e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos no escuro. A seguir, cada amostra foi processada no preparador automático de amostras⁴ que

¹ Contador eletrônico de células® - Celm - Modelo CC 510.

² Corante Panótico para Hematologia – Laborclin.

³ Produtos para Laboratórios – Laborlab.

⁴ Aparelho Coulter Q-Prep® - Beckman Coulter.

possui um sistema composto por uma unidade de preparação da amostra (misturador a 35 ciclos/segundos, sistema de distribuição dos reagentes e relógio eletrônico) e uma unidade química que trabalha com os reagentes¹ A, B e C que respectivamente, proporcionam a lise eritrocitária, estabiliza o pH da amostra e fixa as células com paraformaldeído a 1%. Na Figura 7 estão ilustrados os procedimentos acima descritos.

3.8.4 Análise em citômetro de fluxo das subpopulações linfocitárias do sangue periférico canino marcadas com anticorpos fluorescentes

As amostras foram levadas ao aparelho citômetro de fluxo² (Figura 8). Este aparelho dispõe de um sistema que gera um fluxo laminar de células, de forma que as células em suspensão marcadas com os anticorpos fluorescentes, passam uma a uma frente a um feixe de raios laser que causa excitação e conseqüente emissão de ondas luminosas de diferentes comprimentos. Estas ondas luminosas sofrerão desvios de acordo com as características das células, e serão captadas por detectores ultra-sensíveis, denominados fotomultiplicadores (FMT), situados diretamente à frente do emissor de raios laser ou a 90° deste. Os sinais captados pelo detector diretamente à frente do feixe luminoso chamado de *Forward Scatter* (FSC) refletem o tamanho celular, enquanto que os gerados pelo detector a 90° chamados de *Side Scatter* (SSC) refletem a granularidade (ou complexidade) citoplasmática da célula.

As duas medidas celulares foram representadas em um histograma (ou gráfico de pontos), estando na ordenada, registrado o FSC, e na abscissa, o SSC. Finalmente, todos esses sinais eletrônicos dos detectores são retransmitidos para um microcomputador, que registra os resultados. Os valores limites de fluorescência que definem a positividade, como também o gating, que é a região demarcada no histograma, correspondente a população celular a ser analisada, são estabelecidos primeiramente para cada amostra na análise do controle negativo. Os valores obtidos dos linfócitos T CD4+ e CD8+ foram expressos em porcentagens (Dean et al., 1991; Wheelless, 1991).

¹ Imunoprep Reagent for Multi® - Beckman Coulter.

² FACSCalibur - Becton Dickinson.

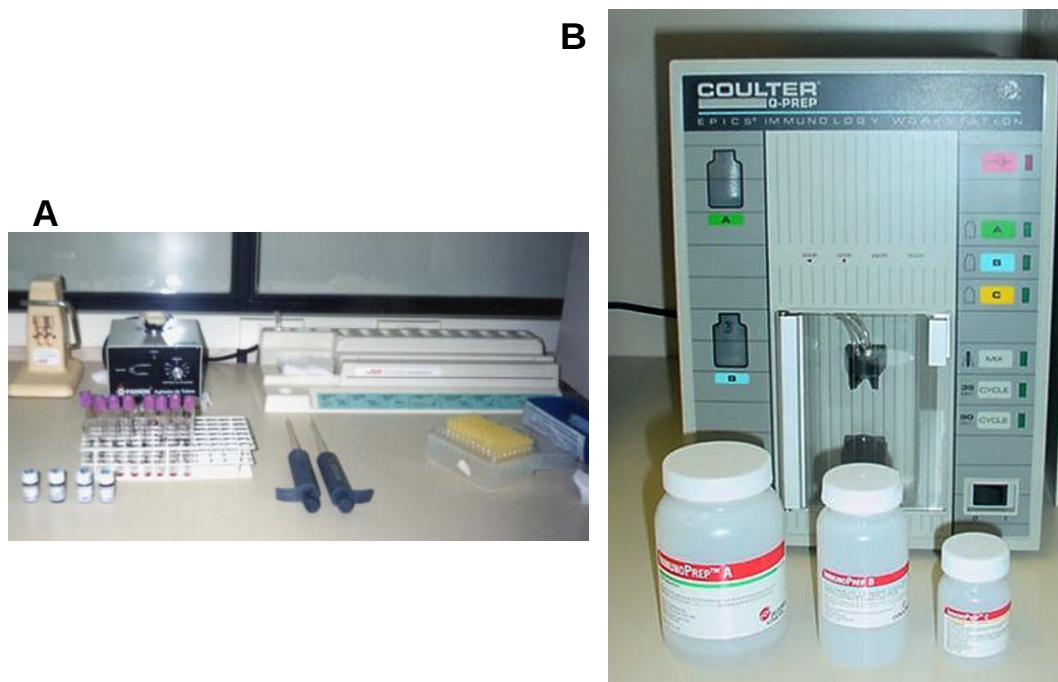


Figura 7- Amostras de sangue e material utilizado para o procedimento de marcação dos linfócitos com anticorpos monoclonais, frascos dos monoclonais, pipetas e pipetadores de 100 e 10 μ L (A). Aparelho Q-prep com os três frascos contendo as soluções utilizadas (B).



Figura 8- Citômetro de fluxo pertencente ao Laboratório da FMB, UNESP, Campus de Botucatu com as amostras de sangue preparadas para análise.

3.9 Análise estatística

No experimento foram utilizados três grupos com 10 animais em cada, avaliados em sete momentos. Foram calculados a média ($\bar{x}$) e o desvio padrão (s) de cada variável nos momentos avaliados. Os valores foram apresentados em tabelas (perfis dos grupos no conjunto dos sete momentos) e figuras. Para cada variável foi empregado a Análise de Perfil (Morrison, 1990), com os testes das hipóteses descritas a seguir:

1. interação entre grupos e momentos: esta hipótese verificou a similaridade (ausência de interação) ou não similaridade (presença de interação) entre os perfis médios de cada grupo;

2. diferença entre grupos no conjunto dos momentos: esta hipótese só teve sentido no caso de ausência de interação em (1) e verificou se os perfis, além de similares, são iguais ou em níveis diferentes;

3. diferença entre momentos no conjunto dos grupos: esta hipótese, também, só foi utilizada no caso de ausência de interação e verificou efeito de momento, no conjunto dos três grupos;

4. diferença entre grupos em cada momento;

5. diferença entre momentos em cada grupo.

As estatísticas F calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Quando $0,05 < p < 0,10$ foi referida tendência à significância.

4 RESULTADOS

4.1 Manejo pré e pós-natal

A manutenção das cadelas gestantes, em jaulas individuais no canil-maternidade proporcionou tranquilidade às gestantes. Muito importante foram os passeios realizados ao ar livre com as cadelas, fato que além de exercitar o animal, mantêm uma relação de amizade e confiança.

A realização de hemograma, urinálise, parasitológico de fezes na primeira semana de chegada das gestantes, e aproximadamente a 15 dias da data prevista ao parto demonstrou que as cadelas, embora provenientes do Biotério, apresentavam-se híginas.

Os exames sorológicos de toxoplasmose, leptospirose e brucelose realizados nesta fase, apresentaram resultados negativos.

4.2 Evolução dos pesos dos animais

O acompanhamento dos neonatos quanto ao ganho de peso, do terceiro ao décimo dia do nascimento, e após, semanalmente até 31 dias de vida, mostrou que os tratamentos não tiveram influência no crescimento dos filhotes. Foi constatado que durante o período experimental, o comportamento foi muito semelhante nos três grupos, sendo os ganhos de pesos equivalentes, tanto na fase de amamentação, como após o início da alimentação pastosa que ocorreu no 21^o dia do nascimento (Figura 9).

A partir da primeira pesagem ($\bar{X}$ dos 3 grupos = 334 g) até a última realizada aos 31 dias de vida ($\bar{X}$ dos 3 grupos = 1,267 g), o ganho de peso global foi próximo dos 379%.

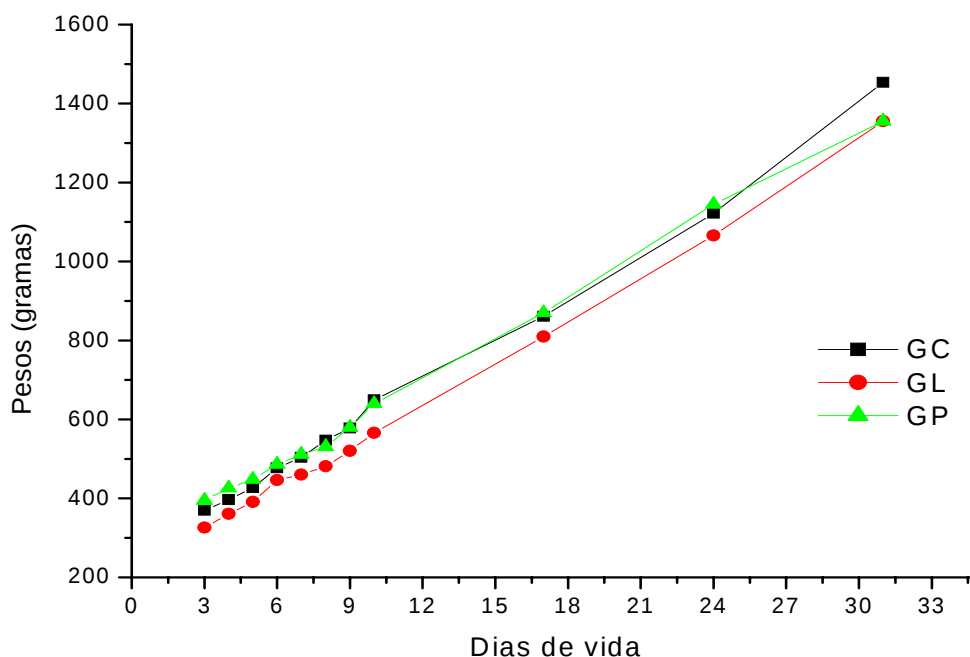


Figura 9- Pesos médios obtidos nos dias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 24 e 31 dias de vida, em animais não tratados (Grupo Controle - GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína - GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus - GP). Os valores correspondentes ao terceiro dia representam os controles de cada grupo.

4.3 Comportamento dos leucócitos e linfócitos totais

Na Tabela 1 estão mostrados as médias ($\bar{X}$) e os desvios padrões ($\pm s$) dos leucócitos totais nas amostras de sangue periférico de neonatos de três a 45 dias de vida submetidos ou não às terapias imunomodulatórias. No Anexo 2 está resumido a análise estatística (perfil dos leucócitos totais). Verificou-se interação significativa entre os três grupos e os sete momentos, ou seja, perfis não similares, fato que demonstrou a ocorrência de diferenças entre grupos no conjunto dos momentos, bem como, entre momentos no conjunto dos grupos.

Na análise entre grupos em cada momento, constatou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos em qualquer dos momentos testados.

Com relação à análise entre momentos em cada grupo foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$). No GC, os M 1 e M 3 foram iguais ($\bar{X} = 8.785$) e, menores que os M 4 e M 7 ($\bar{X} = 11.601$) que foram iguais. Ressalta-se que o M 7 ($\bar{X} = 11.639$), foi significativamente maior que o M 1 ($\bar{X} = 8.740$). Para o

GL, os M 1 e M 6 foram iguais e inferiores ($\bar{X} = 8.315$) aos M 2, M 5 e M 7 que apresentaram comportamentos iguais ($\bar{X} = 12.321$). Da mesma forma que ocorreu no GC o M 7 mostrou diferença significativa e maior em relação ao M 1 ($\bar{X} = 12.093$ e 8.390 , respectivamente). Já o grupo GP, apresentou comportamento diferente dos grupos anteriores, onde os M 1, M 3, M 4, M 6 e M 7 mostraram-se iguais ($\bar{X} = 9.989$) e menores apenas que o M 2 ($\bar{X} = 13.164$). Neste grupo não ficou evidenciada diferença significativa entre o M 7 ($\bar{X} = 10.833$) e o M 1 ($\bar{X} = 9.130$). Na Figura 10 está representada a evolução das médias dos leucócitos totais nos 3 grupos e respectivos momentos.

Na Tabela 2 estão mostrados as $\bar{X}$ e os s dos linfócitos totais, cuja análise estatística (perfil dos linfócitos totais) está resumida no Anexo 3. Verificou-se ausência de interação significativa entre os 3 grupos e os 7 momentos, ou seja, perfis similares. A análise da hipótese de diferença entre grupos no conjunto dos momentos não foi constatada, demonstrando perfis iguais. Na análise de diferença entre momentos no conjunto dos grupos foi verificado que o M 1 foi igual a M 3 ($\bar{X} = 2.304$ e 2.769 , respectivamente) e menores que M 2, M 4 e M 5 ($\bar{X} = 3.535$, 3.576 e 3.646 , respectivamente). De forma semelhante ao ocorrido na contagem de leucócitos totais, não foi demonstrada diferença na análise entre grupos em cada momento.

Na análise entre momentos em cada grupo, foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$). Assim, no GC, os M 1 e M 3 foram iguais ($\bar{X} = 2.486$) e menores que os M 2, M 4 e M 5 ($\bar{X} = 3.617$), que foram também iguais. O M 7 ($\bar{X} = 3.194$) não mostrou diferença significativa do M 1 ($\bar{X} = 3.194$). Quanto ao GL, os M 1, M 3 e M 6 foram iguais e inferiores ($\bar{X} = 2.517$) aos M 2, M 4 e M 5 que apresentaram comportamento igual ($\bar{X} = 3.538$), sem entretanto, mostrar diferença significativa entre M 7 ($\bar{X} = 3.102$) e M 1 ($\bar{X} = 2.182$). No GP apenas o M 1 ($\bar{X} = 2.391$) mostrou-se inferior a igualdade entre M 2, M 4 e M 5 ($\bar{X} = 3.607$). Não ocorreu diferença entre M 1 e M 7 ($\bar{X} = 2.391$ e 2.908 , respectivamente). A evolução das $\bar{X}$ dos linfócitos totais nos 3 grupos e respectivos momentos está apresentada na Figura 11.

Com relação à análise dos linfócitos totais, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) podem ser observadas entre alguns momentos nos três grupos, comparadas ao M 1. No M 2 dos 3 grupos, houve um aumento significativo, enquanto que no M 3 ocorreu uma queda acentuada, principalmente no GC e no GL. No M 4 ocorreu uma elevação dos linfócitos nos grupos e continuidade desta no M 5 apenas para os GL e GP, com retorno aos níveis basais no M 6 e M 7, embora com tendência a superioridade.

Tabela 1- Médias e desvios padrões ($\pm$) dos leucócitos totais (μL) do sangue periférico, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle - GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína - GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus - GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada

	Momentos							Médias dos Grupos
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
Grupos								
GC	8.740 $\pm$ 1812 b*	10.170 $\pm$ 2.442 ab	8.831 $\pm$ 2.014 b	11.563 $\pm$ 2.640 a	10.058 $\pm$ 2.392 ab	9.815 $\pm$ 2.156 ab	11.639 $\pm$ 3.574 a	10.116
GL	8.390 $\pm$ 1.520 b	12.427 $\pm$ 4.108 a	9.443 $\pm$ 2.261 ab	10.052 $\pm$ 3.083 ab	12.444 $\pm$ 3.888 a	8.241 $\pm$ 1.205 b	12.093 $\pm$ 2.964 a	10.441
GP	9.130 $\pm$ 1.823 b	13.164 $\pm$ 3.089 a	9.897 $\pm$ 2.572 b	10.434 $\pm$ 1.499 b	11.181 $\pm$ 3.314 ab	9.655 $\pm$ 3.223 b	10.833 $\pm$ 2.121 b	10.614
Médias dos Momentos	8.753	11.920	9.391	10.683	11.228	9.237	11.522	

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre momentos dentro de cada grupo.

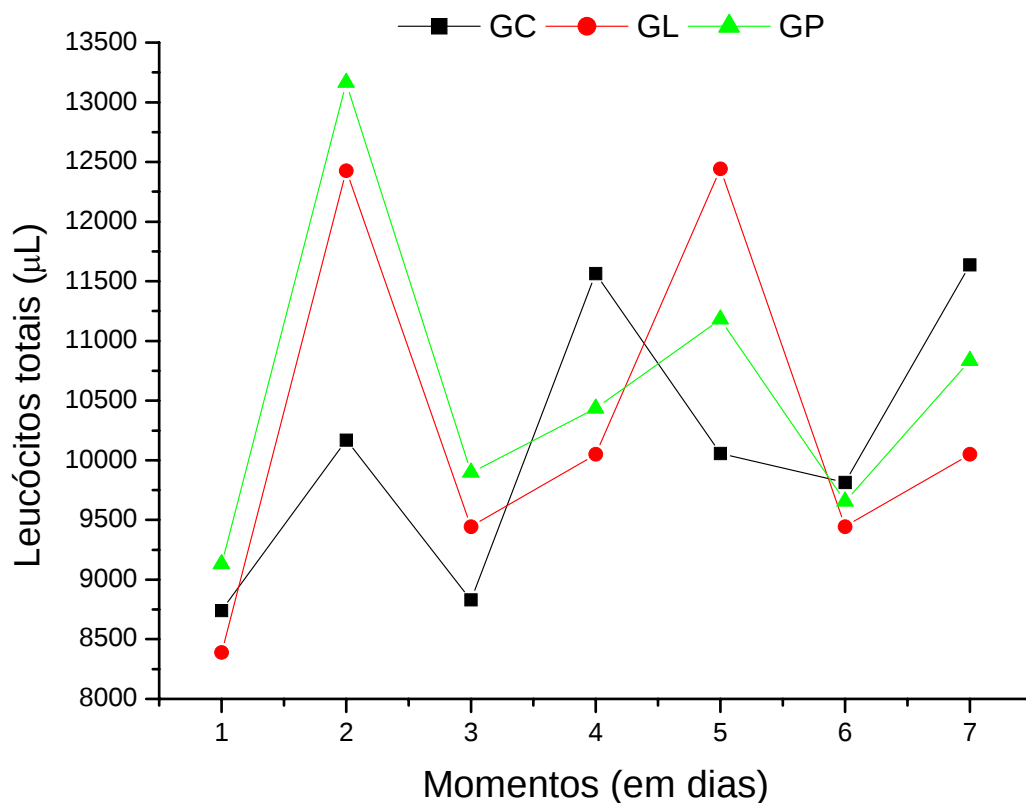


Figura 10- Evolução das médias dos leucócitos totais (μL) do sangue periférico, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle - GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína - GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus - GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada.

Tabela 2- Médias e desvios padrões ($\pm$) dos linfócitos totais (μ L) do sangue periférico, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle - GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína - GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus - GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada

Grupos	Momentos							Médias dos Grupos
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
GC	2.340 $\pm$ 740 b*	3.449 $\pm$ 942 a	2.632 $\pm$ 992 b	3.957 $\pm$ 1.526 a	3.447 $\pm$ 1.293 a	3.178 $\pm$ 884 ab	3.194 $\pm$ 1.197 ab	3.171
GL	2.182 $\pm$ 733 b	3.660 $\pm$ 589 a	2.672 $\pm$ 712 b	3.369 $\pm$ 1.187 a	3.565 $\pm$ 1.090 a	2.697 $\pm$ 797 b	3.102 $\pm$ 1.051 ab	3.035
GP	2.391 $\pm$ 824 b	3.496 $\pm$ 657 a	3.003 $\pm$ 1.131 ab	3.400 $\pm$ 904 a	3.925 $\pm$ 1.595 a	2.826 $\pm$ 923 ab	2.908 $\pm$ 963 ab	3.136
Médias dos Momentos	2.304 b	3.535 a	2.769 b	3.576 a	3.646 a	2.900 ab	3.068 ab	

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre momentos dentro de cada grupo.

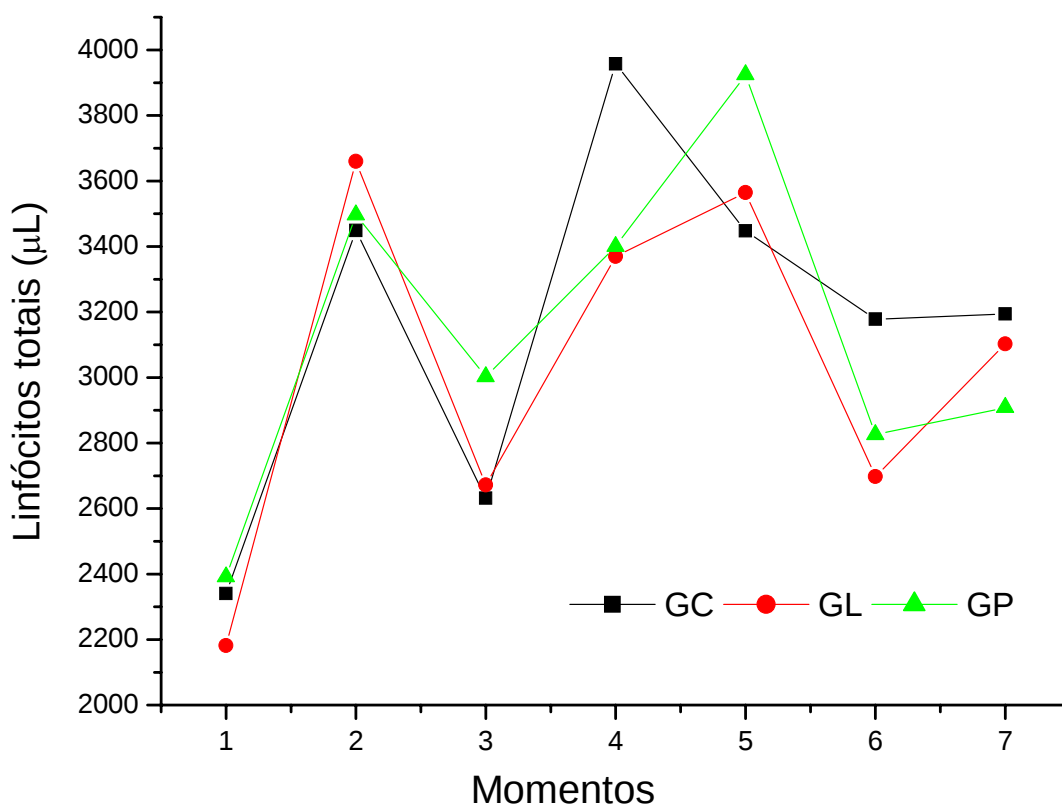


Figura 11- Evolução das médias dos linfócitos totais (μL) do sangue periférico, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle - GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína - GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus - GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada.

4.4 Comportamento dos LT CD4+ e CD8+ e evolução da relação CD4+ e CD8+ (CD4+:CD8+) do sangue periférico

Nas Tabelas 3, 4 e 5 estão mostradas as $\bar{X}$ e os $\pm s$ dos percentuais das subpopulações de LT CD4+, LT CD8+ e a relação CD4+:CD8+, respectivamente, das amostras de sangue periférico de neonatos de três a 45 dias de vida submetidos ou não às terapias imunomodulatórias. Nos Anexos 4, 5 e 6 estão resumidos as análises estatísticas, correspondentes ao perfil dos percentuais respectivos das subpopulações de LT CD4+, LT CD8+ e da CD4+:CD8+.

Na interação entre os grupos e momentos, verificou-se significância ($p < 0,05$), ou seja, perfis não similares, fato que demonstrou a ocorrência de diferenças entre grupos no conjunto dos momentos, bem como, entre momentos no conjunto dos grupos.

Na análise entre grupos em cada momento para ambas subpopulações de LT CD4+ e CD8+, não houve diferenças significativas.

As análises entre os momentos em cada grupo, para LT CD4+, demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$). Assim, no GC, o M 1 ($\bar{X} = 24,9\%$) foi menor do que os M 2, M 4 e M 5 que foram iguais ($\bar{X} = 35,5\%$). Para o GL, o M 1 ($\bar{X} = 20,6\%$) foi também menor do que os momentos M 2, M 3, M 4, M 5, M 6 e M 7 que foram iguais ($\bar{X} = 30,5\%$). No grupo GP, o M 1 ($\bar{X} = 26,4\%$) foi menor que a média dos M 2, M 4, M 5 e M 7 que também foram iguais ($\bar{X} = 33,7\%$).

Com relação aos LT CD8+, também ocorreram diferenças significativas. No GC, o M 1 ($\bar{X} = 2,7\%$) foi menor do que as médias de M 2 e M 5 que foram iguais ($\bar{X} = 7,7\%$) e menores que M 3 e M 4 ($\bar{X} = 12,4\%$). Para os GL e GP, os M 1 apresentaram $\bar{X} = 3,6\%$ e $2,7\%$, respectivamente, ambas menores que os demais momentos, que foram iguais e apresentaram $\bar{X} = 10,1\%$ e $10,0\%$ nesta ordem.

Na análise da relação CD4:CD8 entre momentos em cada grupo foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$). No GC, o M 1 ($\bar{X} = 10$) foi maior que os M 3, M 4, M 6 e M 7 que apresentaram médias iguais ($\bar{X} = 3,5$). Para o GL, o M 1 e M 2 foram iguais ($\bar{X} = 6,5$) e maior que M 7 ($\bar{X} = 3$) que foi iguais aos demais

momentos. No GP, o M 1 ($\bar{X} = 11$) foi maior do que M 2 ($\bar{X} = 6$) e ambos foram maiores que os demais momentos, que foram iguais ($\bar{X} = 3,4$).

Os valores de CD4+ e CD8+ foram expressos em porcentagens de células positivas marcadas em histograma, como pode ser observado nas Figuras 12, 13 e 14, provenientes dos filhotes de número 6 do GC, de número 1 do GL e de número 6 do GP, respectivamente. Assim, visando a comparação dos percentuais obtidos no citômetro, com os valores absolutos calculados a partir do número total de linfócitos, na Tabela 6 estão mostradas as $\bar{X}$ e os $\pm s$ dos valores absolutos das subpopulações de LT CD4+ e T CD8+ (μL), o que permitiu avaliar a relação CD4+:CD8+ em números absolutos para comparação com a relação CD4+:CD8+ em valores percentuais (Tabela 7).

O desenvolvimento pós-natal das subpopulações linfocitárias CD4+ e CD8+, no terceiro dia de vida (M 1) dos três grupos, foi analisado levando-se em consideração os 30 animais, pois, além de não evidenciar diferença estatística, neste período ainda não havia sido administrado a luteína e *Parapoxvirus* nos grupos GL e GP, respectivamente.

Nas análises dos momentos seguintes em cada grupo, a partir do M 2, a população de LT CD4+, demonstrou um processo de elevação, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparada ao M 1, mantendo-se sempre acima até o M 7, como demonstrado na média dos momentos na Tabela 3, com uma breve tendência de declínio apenas no M 5, voltando a subir no momento seguinte. Quanto ao LT CD8+, a elevação foi também estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao M 1, contudo caracterizada por oscilações nas médias dos momentos de 3 pontos percentuais (Tabela 4). Na Figura 15, está representada a evolução das médias dos percentuais das subpopulações de LT CD4+ e CD8+ e na Figura 16 suas respectivas relações.

Tabela 3- Médias e desvios padrões ($\pm$) dos percentuais das subpopulações de linfócitos T CD4+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle- GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada

Grupos	Momentos							Médias dos Grupos
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
GC	24,9 $\pm$ 16,8 b	36,8 $\pm$ 8,4 a	35,1 $\pm$ 10,4 ab	35,5 $\pm$ 5,9 a	34,2 $\pm$ 19,4 a	33,5 $\pm$ 9,9 ab	30,2 $\pm$ 9,7 ab	33
GL	20,6 $\pm$ 8,4 b	31,1 $\pm$ 10,6 a	33,2 $\pm$ 14,3 a	30,3 $\pm$ 15,2 a	25,9 $\pm$ 10,6 a	32,6 $\pm$ 10,9 a	30,3 $\pm$ 9,9 a	29
GP	26,4 $\pm$ 10,2 b	35,0 $\pm$ 11,2 a	30,7 $\pm$ 11,7 ab	32,6 $\pm$ 8,5 a	30,0 $\pm$ 6,6 a	28,3 $\pm$ 9,1 ab	37,4 $\pm$ 9,3 a	31
Médias dos Momentos	24	34	33	33	30	31	33	

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre momentos dentro de cada grupo.

Tabela 4- Médias e desvios padrões ($\pm$) dos percentuais das subpopulações de linfócitos T CD8+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina (PE) e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle- GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada

Grupos	Momentos							Médias dos Grupos
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
GC	2,7 $\pm$ 1,4 c	8,2 $\pm$ 3,7 b	12,1 $\pm$ 3,6 a	12,8 $\pm$ 4,7 a	7,2 $\pm$ 4,1 b	10,7 $\pm$ 5,2 ab	10,5 $\pm$ 3,0 ab	9
GL	3,6 $\pm$ 1,8 b	7,7 $\pm$ 4,8 a	10,1 $\pm$ 2,6 a	8,8 $\pm$ 3,0 a	9,5 $\pm$ 5,5 a	12,8 $\pm$ 7,4 a	12,1 $\pm$ 6,2 a	9
GP	2,7 $\pm$ 1,4 b	6,8 $\pm$ 2,3 a	10,6 $\pm$ 4,9 a	11,6 $\pm$ 3,8 a	8,6 $\pm$ 4,9 a	10,7 $\pm$ 4,4 a	11,4 $\pm$ 2,9 a	9
Médias dos Momentos	3	8	11	11	8	8	11	

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre momentos dentro de cada grupo.

Tabela 5- Médias e desvios padrões ($\pm$) das relações das subpopulações de linfócitos T CD4+:CD8+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina (PE) e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle- GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada. Os valores médios foram calculados utilizando-se as médias das relações CD4+:CD8+ de cada animal no respectivo grupo

Grupos	Momentos							Médias dos Grupos
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
GC	10 $\pm$ 5 a	5 $\pm$ 3 ab	3 $\pm$ 1 b	3 $\pm$ 1 b	5 $\pm$ 5 ab	4 $\pm$ 2 b	3 $\pm$ 1 b	5
GL	7 $\pm$ 3 a	6 $\pm$ 4 a	4 $\pm$ 2 ab	4 $\pm$ 1 ab	4 $\pm$ 3 ab	4 $\pm$ 3 ab	3 $\pm$ 1 b	5
GP	11 $\pm$ 10 a	6 $\pm$ 2 b	3 $\pm$ 2 c	3 $\pm$ 2 c	5 $\pm$ 2 c	3 $\pm$ 2 c	3 $\pm$ 1 c	5
Médias dos Momentos	9	6	3	3	4	3	3	

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre momentos dentro de cada grupo.

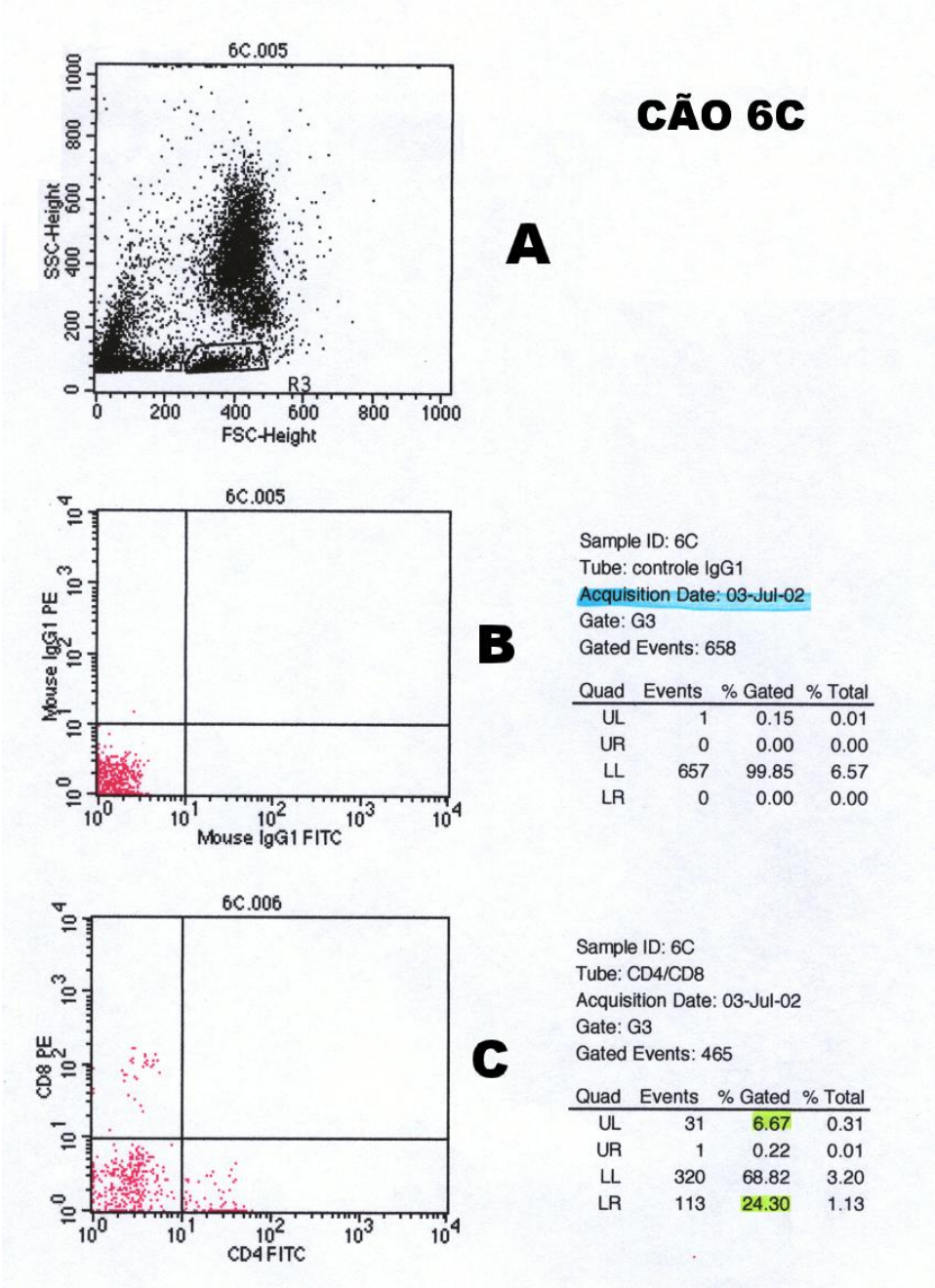
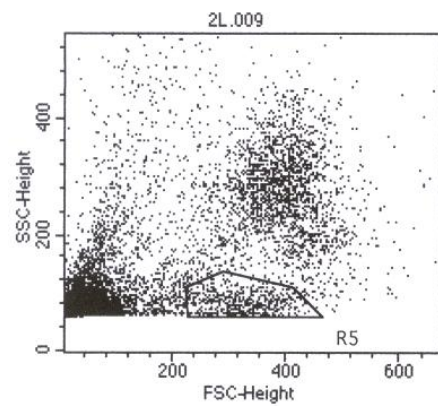
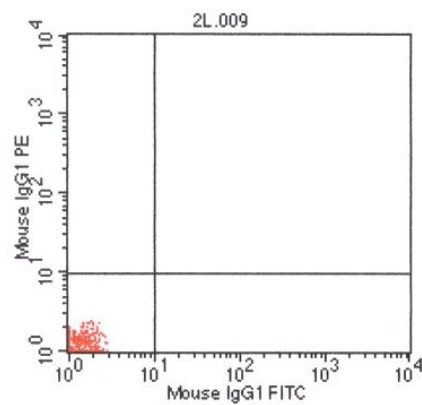


Figura 12- Análise por citometria de fluxo do sangue periférico do neonato canino de número 6 do GC. Histograma de FSC x SSC para delimitar as populações leucocitárias e *gating* em região de linfócitos (A). Divisão do histograma em quatro quadrantes (UL: *upper left*; superior esquerdo; UR: *upper right*; superior direito; LL: *lower left*, inferior esquerdo e LR: *lower right*, inferior direito) e região marcada de negatividade (LL) (B). Histograma de parâmetros de linfócitos marcados com dois anticorpos monoclonais expressos nos quadrantes superior esquerdo (UL) e inferior direito (LR) correspondendo respectivamente, aos linfócitos T CD8+ e CD4+ (C).



CÃO 2L

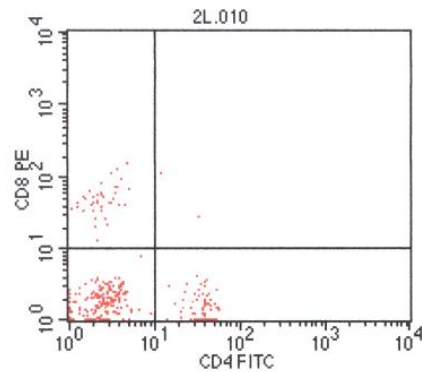
A



B

Sample ID: 2L
Tube: controle IgG1
Acquisition Date: 03-Jun-02
Gated Events: 571

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	0	0.00	0.00
LL	571	100.00	5.71
LR	0	0.00	0.00



C

Sample ID: 2L
Tube: CD4/CD8
Acquisition Date: 03-Jun-02
Gated Events: 320

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	41	12.81	0.41
UR	2	0.62	0.02
LL	181	56.56	1.81
LR	96	30.00	0.96

Figura 13- Análise por citometria de fluxo do sangue periférico do neonato canino de número 1 do GL. Histograma de FSC x SSC para delimitar as populações leucocitárias e *gating* em região de linfócitos (A). Divisão do histograma em quatro quadrantes (*UL*: *upper left*; superior esquerdo; *UR*: *upper right*; superior direito; *LL*: *lower left*, inferior esquerdo e *LR*: *lower right*, inferior direito) e região marcada de negatividade (LL) (B). Histograma de parâmetros de linfócitos marcados com dois anticorpos monoclonais expressos nos quadrantes superior esquerdo (UL) e inferior direito (LR) correspondendo respectivamente, aos linfócitos T CD8+ e CD4+ (C).

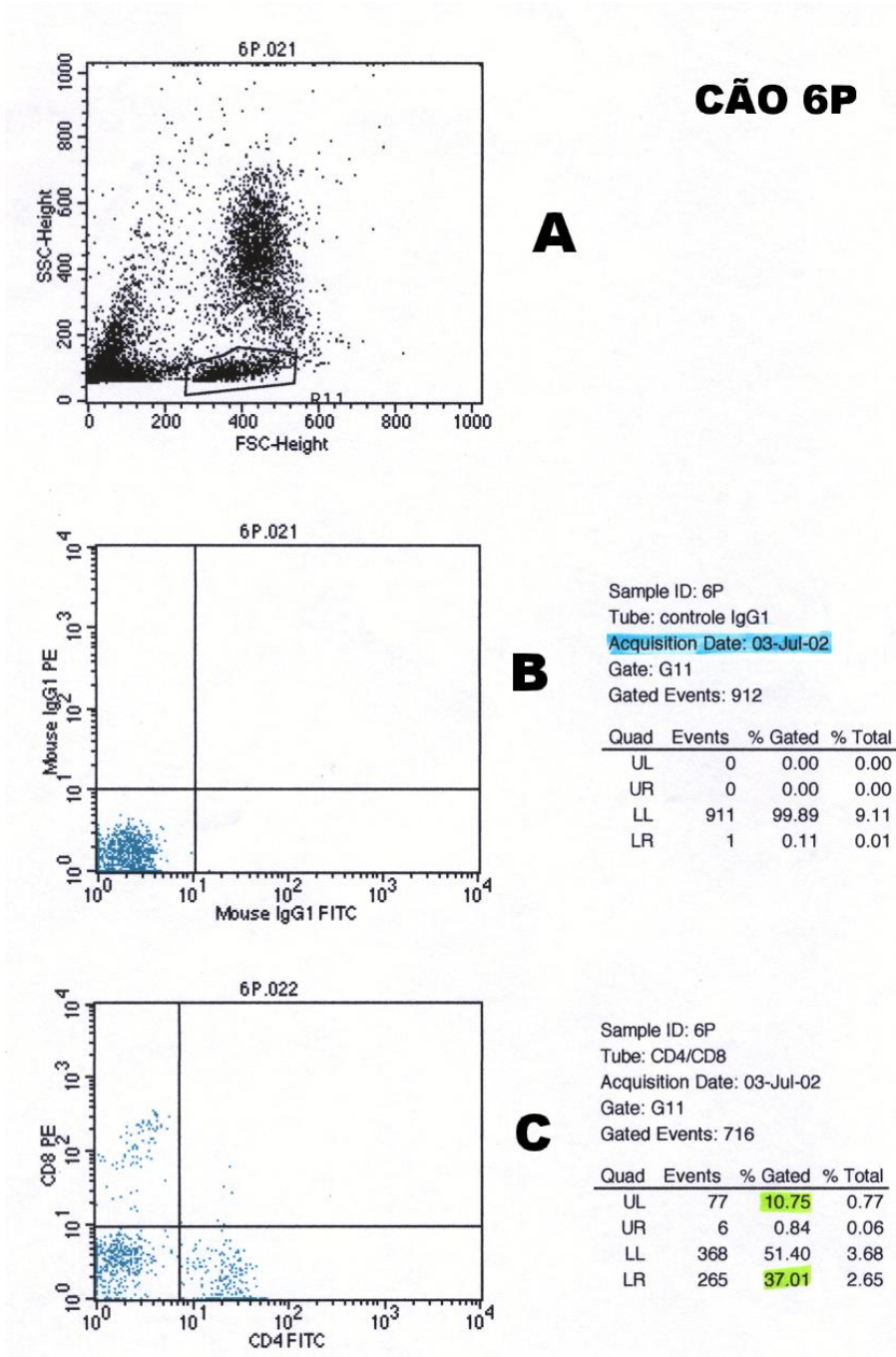


Figura 14- Análise por citometria de fluxo do sangue periférico do neonato canino de número 6 do GP. Histograma de FSC x SSC para delimitar as populações leucocitárias e gating em região de linfócitos (A). Divisão do histograma em quatro quadrantes (*UL*: *upper left*; superior esquerdo; *UR*: *upper right*; superior direito; *LL*: *lower left*, inferior esquerdo e *LR*: *lower right*, inferior direito) e região marcada de negatividade (LL) (B). Histograma de parâmetros de linfócitos marcados com dois anticorpos monoclonais expressos nos quadrantes superior esquerdo (UL) e inferior direito (LR) correspondendo respectivamente, aos linfócitos T CD8+ e CD4+ (C).

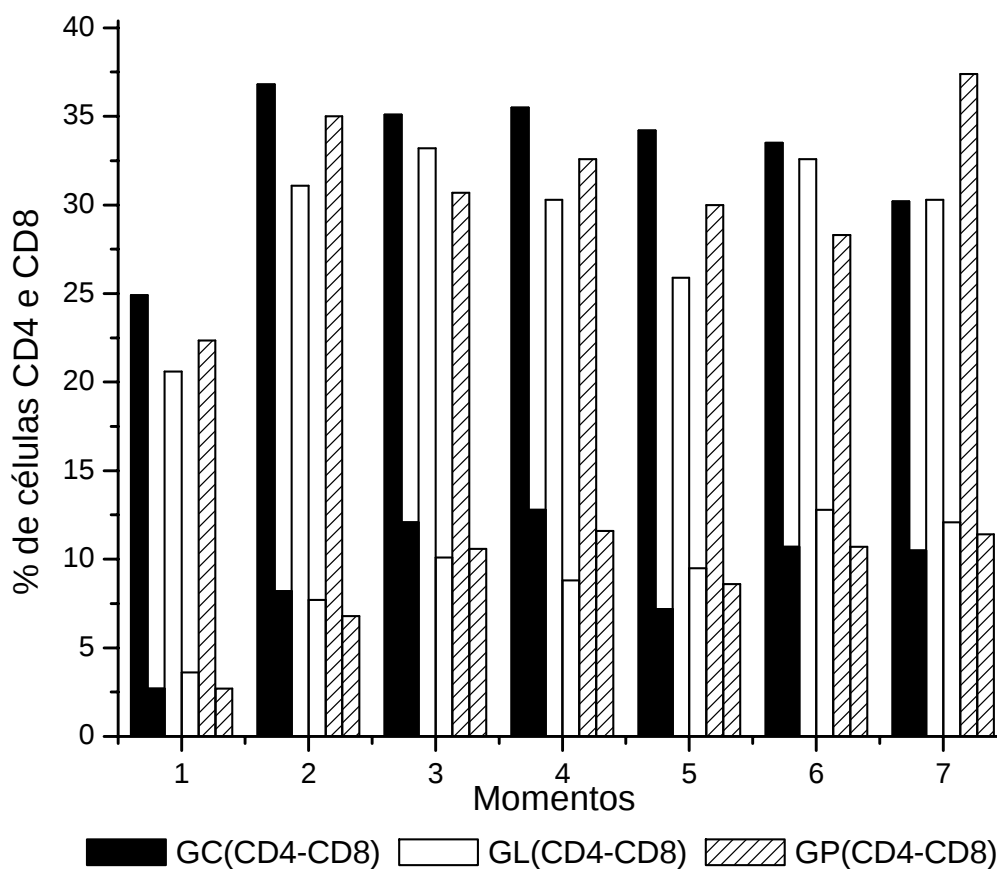


Figura 15- Evolução das médias dos percentuais das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina (PE) e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos 1 a 7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle-GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada.

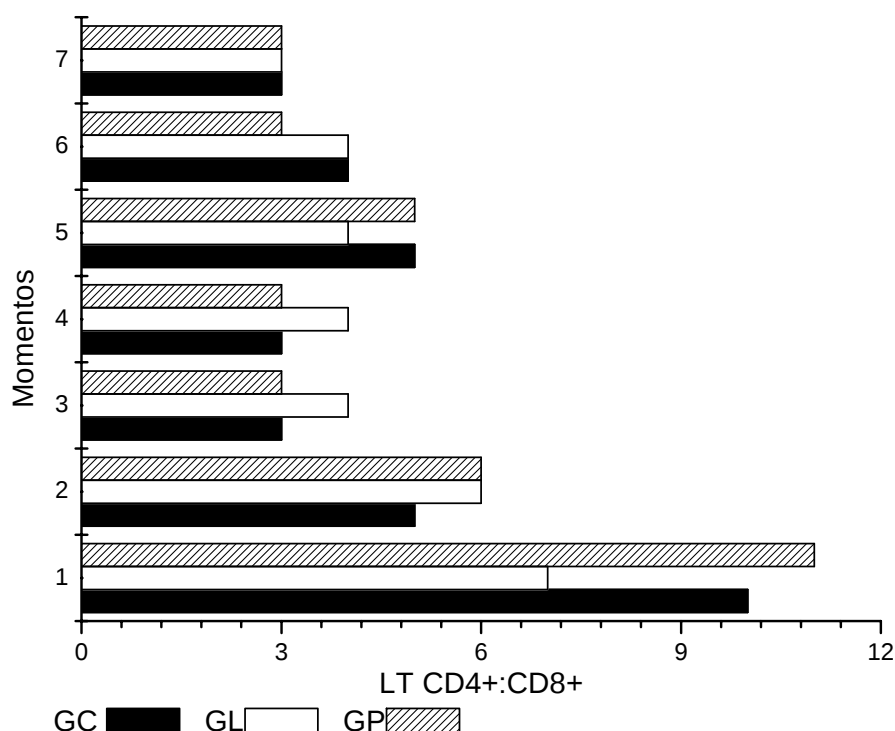


Figura 16- Relações das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina (PE) e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle- GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada. Os valores médios foram calculados utilizando-se as médias das relações CD4+:CD8+ de cada animal no respectivo grupo.

Tabela 6- Médias e desvios padrões ($\pm$) das subpopulações de linfócitos T (LT) CD4+ (células/ μ L) e T CD8+ (células/ μ L) do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina (PE) e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle- GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada. Os valores foram calculados utilizando-se o número total de linfócitos e os percentuais obtidos na citometria de fluxo

Grupos		Momentos						
	LT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
GC	CD4+	565 $\pm$ 426	1267 $\pm$ 413	915 $\pm$ 407	1375 $\pm$ 544	1207 $\pm$ 912	1075 $\pm$ 485	996 $\pm$ 530
	CD8+	58 $\pm$ 31	285 $\pm$ 140	315 $\pm$ 129	516 $\pm$ 320	246 $\pm$ 144	330 $\pm$ 191	348 $\pm$ 179
GL	CD4+	441 $\pm$ 221	1039 $\pm$ 285	922 $\pm$ 569	904 $\pm$ 287	929 $\pm$ 429	854 $\pm$ 288	910 $\pm$ 393
	CD8+	75 $\pm$ 41	275 $\pm$ 169	266 $\pm$ 88	282 $\pm$ 105	356 $\pm$ 316	349 $\pm$ 214	380 $\pm$ 272
GP	CD4+	565 $\pm$ 349	1180 $\pm$ 353	852 $\pm$ 276	1080 $\pm$ 343	1110 $\pm$ 255	785 $\pm$ 346	1052 $\pm$ 337
	CD8+	59 $\pm$ 26	239 $\pm$ 102	326 $\pm$ 194	388 $\pm$ 149	340 $\pm$ 202	317 $\pm$ 210	334 $\pm$ 156

Tabela 7- Comparação das médias e desvios padrões ($\pm$) das relações das subpopulações de linfócitos T CD4+:CD8+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados a ficoeritrina (PE) e analisados no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida, correspondendo respectivamente aos momentos M1 a M7, em 10 animais não tratados (Grupo Controle- GC), 10 tratados, vo, 1 x dia, com 20 mg de luteína (Grupo Luteína- GL) e 10 com administração de uma dose semanal de *Parapoxvirus*, sc (Grupo Parapoxvírus- GP). Os valores correspondentes ao momento 1 representam os controles de cada grupo e a partir do momento 6 nenhuma droga foi mais utilizada

Grupos		Momentos						
	CD4+:CD8+	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
GC	1	10 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 5	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1
	2	10 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	7 $\pm$ 7	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1
GL	1	7 $\pm$ 3	6 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1
	2	7 $\pm$ 3	6 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1
GP	1	11 $\pm$ 10	6 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1
	2	12 $\pm$ 10	6 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1

1 Calculados utilizando-se as médias das relações CD4+:CD8+ de cada animal no respectivo grupo;

2 Calculados utilizando-se o número total de linfócitos (**células/ μ L**) a partir dos percentuais obtidos na citometria de fluxo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Manejo pré e pós-natal

O acompanhamento gestacional é um procedimento de extrema importância tanto para a gestante como para os desenvolvimentos embrionário e fetal (Hoskins, 2001a). As avaliações clínicas semanais, principalmente das condições físicas das cadelas bem como o desenvolvimento pós-natal dos filhotes durante o experimento, serviram como subsídios para confirmar que o uso de uma alimentação balanceada e ricamente protéica procedente de ração comercial, de boa qualidade, suplementou de modo satisfatório as necessidades nessa fase.

Um manejo criterioso em relação à profilaxia de doenças e higiene do ambiente, enriquecido com muita dedicação e carinho aos animais, teve um aspecto altamente positivo. Como resultado pôde-se observar que tanto as gestantes como os filhotes apresentaram boas condições físicas, as parturientes demonstraram instinto materno elogiável e tanto elas como os filhotes, durante todo o experimento, tiveram um comportamento ativo e de grande sociabilidade, o que facilitou sobremaneira as manipulações de que se fizeram necessárias. Os exames laboratoriais do hemograma e da urinálise também forneceram indicativos de que as gestantes apresentavam-se em boas condições de saúde.

Por se tratar de cadelas adquiridas do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu no terço inicial de prenhez, foi importante a realização dos exames sorológicos para toxoplasmose, leptospirose e brucelose, cujos resultados negativos, mostraram que esses animais, mesmo sendo de Biotério, não tiveram contato com esses agentes patológicos.

Na administração do vermífugo para as gestantes, o esquema utilizado em dose única, aos 30 e 55 dias de gestação, e no 21º dia após o parto, juntamente com a primeira dose nos neonatos, levou em consideração o fato de que as fêmeas apresentavam-se no primeiro terço de gestação, e nas principais helmintoses, que afetam as cadelas suscetíveis, as larvas ao atingirem os pulmões podem migrar para os músculos esqueléticos, onde permanecerão latentes. Na prenhez, durante as três últimas semanas, essas larvas ao serem reativadas, migram dos tecidos da cadela para os fetos, ocasionando a transmissão placentária. Após o parto, as migrações destas larvas persistem, e ao atingirem a glândula mamária, podem,

conseqüentemente ser transmitidas aos filhotes pelo leite, por um período aproximado de três semanas após o parto (Germano & Ogassawara, 1986; Urquhart et al., 1998).

A administração da vacina óctupla no 45º dia de gestação visou proporcionar aos neonatos uma oferta maior de anticorpos colostrais contra as principais viroses que poderiam afetá-los na fase neonatal, uma vez que a quantidade dos anticorpos presentes no colostro é proporcional aos anticorpos séricos maternos (Chappuis, 1998). Como as cadelas eram provenientes do Biotério, fez-se a opção de vaciná-las ao final da gestação no sentido de proporcionar uma maior oferta de anticorpos aos neonatos.

A preparação de um ambiente favorável específico para abrigar as parturientes, como o canil-maternidade, foi um dos cuidados iniciais, que deve ser providenciado para a gestante neste período. A familiarização com o local do parto foi um fator que, além de proporcionar confiança a gestante, trouxe a conveniência de eliminar o estresse que poderia ocorrer se mudanças ambientais sucessivas fossem impostas nesta fase.

As dimensões da caixa-maternidade foram escolhidas para confinar os neonatos mais próximos da mãe, impedindo a dispersão indesejável dos mesmos, fato que poderia acarretar a falta de contato materno, levando a hipotermia neonatal, com conseqüente, rejeição por parte da mãe. Nesta situação, os neonatos tornar-se-iam fracos em virtude da queda na alimentação, necessitando de intervenção medicamentosa, o que seria indesejável nesta pesquisa. Neste sentido, se as dimensões desta caixa não estivessem proporcionais ao porte da mãe e o tamanho da ninhada, poderiam também ter ocasionado pisoteio dos neonatos por parte da mãe, quando da necessidade de entrada e saída da caixa-maternidade.

Quanto ao desmame gradativo, iniciado a partir do 21º dia de idade com a introdução de uma dieta láctea, associada com farináceos em forma de papa, e aos 28 dias a alimentação com leite desnatado e ração comercial para filhotes em crescimento¹ proporcionou um período de adaptação importante, para o desmame completo que foi realizado aos 35 dias de vida. Esta ação, portanto, repercutiu no bom desenvolvimento corpóreo e comportamental dos filhotes. Esta transição do leite materno para outros alimentos neste período de desmame, realizado de forma

¹ Pedigree® Júnior – Waltham.

gradual, fez parte de um manejo dietético adequado e, portanto, não foram presenciados quaisquer sinais de distúrbios digestivos.

As mudanças súbitas da alimentação durante a fase de desmame é indesejável, podendo levar a diarreia, e proporcionar elevada mortalidade nesta fase. Além de que a época do desmame é considerada um período estressante para os neonatos, podendo ocasionar uma baixa resistência, e maior susceptibilidade a enfermidades. Dentre estas, a manifestação de uma parasitose intestinal. Portanto, a administração da primeira dose de anti-helmíntico aos neonatos nesta fase foi aconselhável (Barr et al., 1998), e visou eliminar uma provável infestação de *Toxocara* sp e *Ancylostoma* sp., que poderiam ter sido adquiridas pela vias placentária ou pela secreção láctea (Germano & Ogassawara, 1986).

Todas as intervenções realizadas nesta fase visaram, portanto, à obtenção de neonatos saudáveis como também proporcionar o bem-estar aos mesmos. O conhecimento de que na fase neonatal a relação entre a imaturidade do sistema imune e a maior susceptibilidade às enfermidades (Chappuis, 1998), poderia acarretar em prejuízos no desenvolvimento da presente pesquisa, caso os cuidados no manejo acima descritos não fossem realizados.

5.2 Evolução dos pesos dos animais

O peso corporal é um dos aspectos mais importante do exame físico dos animais jovens (Hoskins, 2001b). O desenvolvimento dos neonatos tendo como base o ganho de peso relativo ao período do terceiro ao décimo dia do nascimento e após, semanalmente, até 31 dias de vida, mostrou-se adequado para esta fase. Mesmo considerando a variabilidade de pesos obtidos dentro dos grupos, por se tratarem de animais sem raça definida e de paternidade desconhecida, o ganho de peso médio diário encontrou-se dentro da faixa dos padrões gerais para filhotes caninos que é de 1 a 2 g/dia (Hoskins, 2001a).

Na fase de amamentação, os animais alimentaram-se de forma vigorosa e ativa em mães saudáveis e bem nutridas (Hoskins, 2001a), bem como na fase de desmame o que pode ser demonstrado no ganho de peso médio de 40,87g/dia durante os 31 dias de acompanhamento (Figura 9). Deve ser considerado que tais índices favoráveis foram obtidos a partir de uma alimentação adequada para filhotes caninos, constituída de colostro e leite materno *ad libitum* até a terceira

semana de vida e substituída gradualmente pelo leite de vaca esterilizado, farinha de cereais e ração balanceada, inicialmente pastosa e posteriormente sólida (Hoskins, 2001a).

Os imunomoduladores não influenciaram no ganho de peso dos neonatos tratados, o mesmo fato foi verificado na pesquisas realizadas em gatos e cães adultos suplementados com o carotenóide luteína (Kim et al., 2000 a, b) e não existe registro de tal efeito na literatura com o uso do *Parapoxvírus*. Desse modo, a principal função do acompanhamento do ganho de peso realizado no presente experimento foi determinar se a alimentação láctea fornecida pela mãe e a da fase de transição foi condizente com o desenvolvimento corpóreo neonatal.

5.3 Comportamento dos leucócitos e linfócitos totais

Analisando o comportamento dos leucócitos totais dos grupos em cada momento (Tabela 1 e Figura 10) constatou-se que não houve diferença significativa entre os três grupos em quaisquer dos momentos testados, indicando que o perfil leucocitário não foi modificado independentemente dos tratamentos administrados. Com relação à análise dos linfócitos totais (Tabela 2 e Figura 11), verificou-se a ausência de interação significativa entre os três grupos e os sete momentos, indicando, que os tratamentos também não proporcionaram mudanças nos números de linfócitos totais.

No entanto, pôde-se verificar a ocorrência de oscilações dos leucócitos e linfócitos totais durante as avaliações semanais nos três grupos, porém sempre superiores aos níveis basais. Essas variações fisiológicas podem refletir um sistema imune imaturo o que concorda com os resultados apresentados por Eal et al. (1973); Jain (1993) e Toman et al. (2002).

5.4 Aplicação da técnica de citometria de fluxo, comportamento dos LT CD4+ e CD8+ e evolução da relação CD4+ e CD8+ (CD4+:CD8+) do sangue periférico

Na preparação das amostras de sangue para a citometria de fluxo, o emprego da lise do sangue total, segundo a recomendação das diretrizes da *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (Paxton et al., 1989) empregada

em gatos (Dean et al., 1991; Davidson et al., 1993; Sellon et al., 1996; Kim et al., 2000 a) e em cães (Kim et al., 2000 b; Faldyna et al., 2001; Toman et al., 2002), mostrou ser uma técnica muito simples, prática e rápida. Além de não ser necessário o isolamento dos linfócitos pela técnica de diferença de gradiente de densidade, o que necessitaria de um volume bem maior de sangue, apenas 100 μ L de sangue total de cada amostra foi suficiente para a realização da imunofenotipagem. Portanto, a colheita semanal, de apenas 1 mL de sangue de cada neonato, propiciou, rapidez e menor estresse aos animais.

Com relação ao comportamento de ambas populações de LT, na análise entre grupos em cada momento, a ausência de diferenças significativas entre os GC, GL e GP em qualquer dos momentos testados, indica que independente dos tratamentos administrados, os grupos apresentaram o mesmo perfil, o que reflete a não interferência dos imunomoduladores testados na quantificação de LT CD4+ e CD8+ nos neonatos. Muito embora as pesquisas tenham demonstrado o efeito do carotenóide luteína no aumento da porcentagem de linfócitos que expressam os marcadores CD4+ e CD8+ em gatos e cães suplementados (Kim et al., 2000 a e b), estes animais pesquisados eram adultos e receberam o carotenóide por 12 semanas. Estas pesquisas também demonstraram que os linfócitos dos animais tratados por um tempo menor, não apresentaram uma resposta mitogênica *in vitro* significativa, sugerindo que o tempo de terapia é importante para a luteína exercer sua ação moduladora (Kim et al., 2000 a e b). Como o objetivo da nossa pesquisa foi avaliar o efeito modulador da luteína na fase neonatal durante cinco semanas, o tempo de tratamento inferior ao das pesquisas acima citadas, poderia ter então, contribuído para que o carotenóide luteína não proporcionasse seu efeito imunomodulador como ficou demonstrado.

Quanto às pesquisas realizadas com o imunomodulador de origem viral, sua ação na resposta imune inespecífica dirigida para macrófagos, neutrófilos e células NK na espécie canina foi demonstrada (Mayr, 1978 apud Bayer, 1996, Büttner, 1993 e Mayr & Büttner, 1984 apud Bayer, 1996). No entanto, gatos naturalmente infectados com o vírus da leucemia felina e tratados com este imunomodulador, não foram demonstrados os aumentos quantitativos de LT CD4+, CD8+ bem como na relação CD4+:CD8+ em comparação aos animais controles (Hartmann et al. 1998). Na nossa pesquisa, o grupo de neonatos tratado com o indutor de paraimunidade também não apresentou mudanças quantitativas das

subpopulações linfocitárias, o que sugere que o *Parapoxvirus ovis* inativado não modulou as células participantes da resposta imune celular.

A falta de resposta a ambos imunomoduladores, testados nesta pesquisa, poderia então sugerir, a imaturidade do sistema imune de neonatos de zero a quatro semanas de idade que também ficou demonstrada na pesquisa sobre a transformação blástica dos LT ao mitógeno fitohemaglutinina que se apresentou significativamente reduzida, comparada aos filhotes de seis a 12 semanas de idade (Gerber & Brown, 1974), como também a elevada susceptibilidade de neonatos à infecção pelo vírus da cinomose (Krakowka & Koestner, 1976).

Em pesquisas realizadas em neonatos para o conhecimento da sua imunocompetência, ficou demonstrado que o neonato canino apresenta um sistema imune subdesenvolvido que gradualmente amadurece somente nas primeiras seis a oito semanas de vida (Jacoby et al., 1969; Shifrine et al., 1971; Gerber & Brown, 1974; Stokes & Bourne, 1989 apud Poffenbarger et al., 1991). Por outro lado, esta falta de resposta de neonatos segundo Banks (1982) e Poffenbarger et al. (1991) poderia ser atribuído a fatores como diferenças nas subpopulações dos linfócitos T e de seus estágios de diferenciação ou ainda a fatores supressivos derivados do colostro da cadela como anticorpos e a atividade excessiva de LT supressores.

Embora, o conhecimento dos números absolutos de linfócitos permitam melhores interpretações do que os percentuais obtidos na contagem diferencial à microscopia (Jain, 1993), nos trabalhos com a imunofenotipagem de LT CD4+ e CD8+, a interpretação pode ocorrer tanto sobre os valores expressos em percentagens de células positivas marcadas na amostra de sangue obtida no aparelho de citometria (Greeley et al., 1996; Kim et al., 2000 a, b; Byrne et al., 2000) como nos valores absolutos calculados (Dean et al., 1991; Sellon et al., 1996; Faldyna et al., 2001). De fato foi constatado no presente experimento, que a comparação das proporções CD4+:CD8+ tanto dos percentuais obtidos no citômetro como dos valores absolutos calculados, são muito próximos (Tabela 7) ao longo de todos os momentos verificados.

Ao avaliar os valores percentuais dos LT CD4+ e CD8+ desta pesquisa com os da literatura consultada, apenas a primeira avaliação (M1) correspondente à média obtida dos 30 neonatos aos três dias de vida para CD4+ (24,0%) verificada na Tabela 3 e para CD8+ (3,0%) na Tabela 4, poderia ser comparada aos valores de normalidade pesquisados nos dois únicos trabalhos que utilizaram neonatos,

embora com idade diferente dos animais desta pesquisa. Os valores encontrados por Faldyna et al. (2001) em seis neonatos caninos de cinco a seis dias de vida da raça Beagle (45,6% para CD4 e 7,7% para CD8) e por Toman et al. (2002), em três neonatos da mesma raça com um dia de vida (36,9% para CD4 e 2,7% para CD8) foram superiores comparados aos nossos valores encontrados. Contudo a relação CD4+:CD8+ dos neonatos desta pesquisa no M1 (9,0) demonstrado na Tabela 5 foi superior a obtida pelo primeiro autor (7,0) e não foi realizada pelo segundo.

Deve-se levar em consideração que, ao comparar os valores obtidos nesta pesquisa com os valores de Faldyna et al. (2001) e Tomam et al., (2002), pôde-se observar que além da idade e do número de animais avaliado, principalmente, as diferenças genotípicas entre raças podem provocar variação na atividade do sistema imune, fato este ressaltado por Faldyna et al. (2001). Por outro lado, valores percentuais de CD4+ superiores aos de CD8+, que sempre ocorreram neste experimento devem ser considerados como dentro dos padrões de normalidade (Greeley et al., 1996, Sellon et al., 1996, Faldyna et al., 2001, Toman et al., 2002). Este fato deve ser considerado importante uma vez que a subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4+ desempenham papel fundamental na regulação da resposta imunológica (Lydyard & Grossi, 1994, Williams, 1997; Tizard, 2000; Rogers, 2001), justificando assim a sua presença em níveis superiores aos LT CD8+, ocorrido em toda a fase de avaliação.

Comparando os percentuais de LT CD4+ e CD8+ (respectivamente, Tabelas 3 e 4) desta pesquisa, com os valores obtidos da 1^a a 4^a semana de vida em neonatos por Toman et al. (2002), verificou-se que os percentuais dessas células, ao longo das semanas avaliadas nesta pesquisa, foram inferiores, porém, a ocorrência de variações das subpopulações linfocitárias ficou demonstrada em ambas as pesquisas.

É interessante salientar que a influência da idade nas distribuições das subpopulações de LT CD4+ e CD8+ demonstradas nas pesquisas realizadas principalmente em gatos e cães adultos (George et al., 1993; English et al., 1994; Greeley et al., 1996; Byrne et al., 2000; Faldyna et al., 2001), mostraram padrões de diminuição dos LT CD4+ e aumento de CD8+, promovendo a queda da relação CD4+:CD8+. Isto sugere, conforme os autores consultados, uma relação entre o envelhecimento do animal, a involução do timo e o declínio da resposta imunológica que irão resultar na depressão da atividade dos LT CD4+, importante por

desempenhar um papel central em promover e regular a resposta imune (Makinoden & Kay, 1980, Gillis et al., 1981, Murasko et al., 1987, Thoman & Weigle, 1989, Beckman et al., 1991 e Song et al., 1993). Neste aspecto, nas avaliações aqui realizadas, bem como nas de Toman et al. (2002); pôde-se observar que os valores percentuais de ambas populações linfocitárias T aumentaram, demonstrando a dinâmica dessas populações neste período.

Por outro lado, a obtenção das quantificações das subpopulações de LT CD4⁺ e CD8⁺, apesar de recente, tem sido utilizada tanto em estudos de mapeamento dos padrões normais, quanto no auxílio de uma melhor caracterização de enfermidades de seres humanos (Byrne et al., 2000) sendo já praticada com certa rotina em laboratórios humanos. Na veterinária, no entanto, a técnica de citometria de fluxo até o presente momento, não está sendo utilizada como rotina laboratorial, mas as pesquisas demonstram a sua aplicabilidade no conhecimento do comportamento dos linfócitos em algumas enfermidades dos animais (May et al., 1992; Chabanne et al., 1995a; Chabanne et al., 1995b; Caswell et al., 1997; Bourdoiseau et al., 1997; Sinke et al., 1997). Este fato se deve em parte aos altos custos da técnica, principalmente no que se refere aos anticorpos monoclonais, como também do aparelho de citometria de fluxo.

Assim, considerando que não houve diferenças estatisticamente significativas no que se refere a um esperado efeito imunoestimulante tanto do carotenóide como do antígeno viral, que foram semelhantes aos neonatos do grupo controle, os dados obtidos, no presente experimento poderão ser utilizados como parâmetros básicos para a caracterização das populações de LT CD4⁺ e CD8⁺ em neonatos caninos, sem raça definida, com faixa etária entre três a 45 dias de vida, cujos dados são escassos na literatura.

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que esta pesquisa foi realizada pôde-se concluir que:

1. Os imunomoduladores carotenóide luteína e *Parapoxvirus ovis* não interferiram no desenvolvimento dos neonatos;
2. O imunomodulador carotenóide luteína não produziu mudanças quantitativas nas subpopulações linfocitárias T;
3. O imunomodulador *Parapoxvirus ovis* não produziu mudanças quantitativas nas subpopulações linfocitárias T;
4. As subpopulações de LT CD4+ e CD8+ sofrem oscilações durante o desenvolvimento pós-natal, sendo estas crescentes em relação aos níveis obtidos na primeira quantificação;
5. Em todas as fases, a relação CD4+:CD8+ mostrou superioridade para o primeiro tipo celular, sendo que a maior relação entre CD4+ e CD8+ ocorreu no 3^o dia de vida;
6. O estabelecimento da quantificação das subpopulações de LT CD4+ e CD8+, bem como da sua relação, pode ser referido tanto pela percentagem quanto pelo cálculo do número absoluto de células.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^{1, 2}

AHMAD, B. The fate of carotene after absorption in the animal organism. **Biochem. J.**, v. 25, p. 1195-204, 1931.

ALEXANDER, M.; NEWMARK, H.; MILLER, R. G. Oral beta-carotene can increase the number of OKT4+ cells in human blood. **Immunol. Lett.**, v. 9, p. 221-224, 1985.

BAKER, H. et al. Blood vitamin and choline concentrations in healthy domestic cats, dogs, and horse. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 1468-1471, 1986.

BANKS, K. L. Host defense in the newborn animal. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 181, p. 1053-1056, 1982.

BARCENA, A. et al. Lymphoid and myeloid differentiation of fetal liver CD34+ lineage- cells in human thymic organ culture. **J. Exp. Med.**, v.180, p. 123-132, 1994.

BARR, S. C. et al. Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate, and febantel agaisnt giardiasis in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 59, n.9, p.1134-1136, 1998.

BAYER. **Baypamun**: informações sobre o produto. São Paulo: Departamento de Saúde Animal, 1996. 23p.

BECKMAN, I. et al. Age related clanged in the activation requirements of human CD4+ T cell subsets. **Cell. Immunol.**, v. 132, p. 17-25, 1991.

BENDICH, A.; SHAPIRO, S. S. Effect of beta-carotene and canthaxanthin on immune responses of the rat. **J. Nutr.**, v. 116, p. 2254-2262, 1986.

BLECHA, F. Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p. 2084-2090, 1988.

BÖTTCHER, E. Clinical trials and field experiences with parapoxirus-based immunostimulations in company animals. In: SYMPOSIUM ABOUT IMMUNOMODULATORS OF THE WORLD ASSOCIATION VETERINARY MICROBIOLOGISTS, IMMUNOLOGISTS AND SPECIALISTS IN INFECTIOUS DISEASES, 13., 1994, Perugia. **Extract...** Perugia, 1994. p. 28-33.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 345-351, 1997.

BOYUM, A. Separation of white blood cells. **Nature**, v. 204, p. 793-794, 1964.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

² BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BREASILE, J. E. Neurologic and behavioral development in the puppy. **Vet. Clin. North Am.**, v. 8, p.31-45, 1978.

BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutr. Res.**, v. 17, p. 547-580, 1997.

BURTON, G. W. Antioxidant action of carotenoids. **J. Nutr.**, v. 119, p. 109-111, 1989.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, p. 560-573, 1984.

BUTLER, J. E. Synthesis and distribution of immunoglobulins. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 163, p. 795-798, 1973.

BÜTTNER, M. History and research on Poxvirus-based immunostimulation. In: SYMPOSIUM ABOUT IMMUNOMODULATORS OF THE WORLD ASSOCIATION VETERINARY MICROBIOLOGISTS, IMMUNOLOGISTS AND SPECIALISTS IN INFECTIOUS DISEASES, 13., 1994, Perugia. **Extract...** Perugia, 1994. p. 6-9.

BÜTTNER, M. Principles of paramunization, option and limits in veterinary medicine. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 1-10, 1993.

BYRNE, K.M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 73, p. 167-182, 2000.

CANFIELD, L. M.; FORAGE, J. W.; VALENZUELA, J. G. Carotenoids as cellular antioxidants. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 200, p. 260-265, 1992.

CASWELL, J. L. et al. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. **Vet. Pathol.**, v. 34, p. 279-287, 1997.

CERVENY, C. et al. Lutein uptake by blood and leukocytes in the dog. **FASEB J.**, v. 12, p. A8857, 1998.

CHABANNE, L. et al. Abnormalities of lymphocyte subsets in canine systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 22, p. 1-8, 1995a.

CHABANNE, L. et al. Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 49, p. 189-198, 1995b.

CHAPPUIS, G. Neonatal immunity and immunization in early age: lessons from veterinary medicine. **Vaccine**, v. 16, p. 1468-1472, 1998.

CHEW, B. P. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1804S-1808S, 1995.

CHEW, B. P.; WONG, M. W.; WONG, T. S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Res.**, v. 16, p. 3689-3694, 1996.

CHEW, B. P. et al. Uptake of β -carotene by plasma and lymphocytes in cats. **FASEB J.**, v. 10, p. A 447, 1997.

CHEW, B. P. et al. The role of dietary lutein in the dog and cat. **Recent Canine Feline Nutr.**, v.2., p. 547-554, 1998.

CLAUSEN, S. W. Carotenemia and resistance to infection. **Trans. Am. Pediatr. Soc.**, v. 43, p. 27-30, 1931.

COLVIN, R. B.; PREFFER, F. L. New technologies in cell analysis by flow cytometry. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 111, p. 628-632, 1987.

DAVIDSON, M. G. et al. Feline immunodeficiency virus predisposes cats to acute generalized toxoplasmosis. **Am. J. Pathol.**, v. 143, p. 1496-1497, 1993.

DEAN, G.A. et al. A Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 28, p. 327-335, 1991.

Di MASCIO, P.; MURPHY, M. E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 153, p. 194- 200, 1991.

EARL, F. L. et al. The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling beagle dogs. **Lab. Anim. Sci.**, v. 23, p. 690-695, 1973.

ENGLISH, R. V. et al. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p. 543-552, 1994.

EPLER, K. S. et al. Evalution of reserved-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. **J. Chromatogr.**, v. 595, p. 89-101, 1992.

EPLER, K. S.; ZIEGLER, R. G.; CRAFT, N. E. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinods and tocopherols in human serum in food. **J. Chromatogr.**, v. 619, p. 37-48, 1993.

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dog- a flow cytometric study. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 82, p. 23-37, 2001.

GARTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to β -carotene in the human. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 66, p. 119-125, 1996.

GEBHARD, D. H.; CARTER, P. B. Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 33, p. 187-199, 1992.

GEORGE, J. W.; PEDERSEN, N. C.; HIGGINS, J. The effect of age on the course of experimental feline immunodeficiency virus infection. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 9, p. 897-905, 1993.

GERBER, J. D.; BROWN, A. L. Effect of development and aging on the response of canine lymphocytes to phytohemagglutinin. **Infect. Immun.**, v. 10, p. 695-699, 1974.

GERMANO, P. M. L.; OGASSAWARA, S. Gastroenterites parasitárias dos cães e gatos. **Hora Vet.**, n. 31, p. 35-39, 1986.

GILLETE, D. D.; FILKINS, M. Factors affecting antibody transfer in newborn puppy. **Am. J. Physiol.**, v. 210, p. 410-422, 1966.

GILLIS, S. et al. Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. **J. Clin. Invest.**, v. 67, p. 937-942, 1981.

GREELEY, E. H. et al. The influence of age on the canine immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.55, p. 1-10, 1996.

GREEN, H.; MELLANBY, E. Carotene and vitamin A: the anti-infective action of carotene. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 11, p. 81-89, 1930.

HARTMANN, K. et al. Treatment of feline leukemia virus-infected cats with paramunity inducer. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 65, p. 267-275, 1998.

HEDDLE, R. J.; ROWLEY, D. Dog immunoglobulins. I. Immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. **Immunology**, v. 29, p. 185-196, 1975.

HENNESSY, K. J. et al. Effects of the immunostimulant Baypamun on the clinical and immunologic response of dogs and horses to viral challenge. In: SYMPOSIUM ABOUT IMMUNOMODULATORS OF THE WORLD ASSOCIATION VETERINARY MICROBIOLOGISTS, IMMUNOLOGISTS AND SPECIALISTS IN INFECTIOUS DISEASES, 13., 1994, Perugia. **Extract...** Perugia, 1994. p. 34-41.

HOSKINS, J. D. Nutrition and nutritional problems. In: _____. **Veterinary pediatrics: dogs and cats from birth to six months**. Philadelphia: Saunders, 2001a. cap. 21, p. 476-489.

HOSKINS, J.D. The physical examination. In: _____. **Veterinary pediatrics: dogs and cats from birth to six months**. Philadelphia: Saunders, 2001b. cap. 1, p. 1-7.

HOSKINSON, C. D.; CHEW, B. P.; WONG, T. S. Effects of injectable beta-carotene and vitamin A on lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in piglets. **Biol. Neonates**, v. 62, p. 325-336, 1992.

JACOBY, R. O.; DENNIS, R. A.; GRIESEMER, R. A. Development of immunity in fetal dogs: humoral responses. **Am. J. Vet.**, v. 30, p. 1503-1509, 1969.

JACOBY, R. O.; GRIESEMER, R. A. Immunologic injury to dogs. **Adv. Vet. Sci.**, v.14. p. 150-187, 1970.

JAIN, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. In: _____. **Hematologic Techniques**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 45-48.

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 19-53.

JYONOUCHI, H. et al. Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigen. **Nutr. Cancer**, v. 21, p. 47-58, 1994.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; GROSS, M. Effects of carotenoids on *in vivo* immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances *in vitro* immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. **Nutr. Cancer**, v. 23, p. 171-183, 1995.

KIM, H. W. et al. Modulation of humoral and cell-mediated immune response by dietary lutein in cats. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 73, p. 331-341, 2000a.

KIM, H. W. et al. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 74, p. 315-327, 2000b.

KRAKOWKA, S. et al. Effects of canine distemper virus on lymphoid function *in vitro* and *in vivo*. **Infect. Immun.**, v. 11, p. 1069-1078, 1975.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **J. Infect. Dis.** v. 134, p. 629-632, 1976.

KRETZDORN, D., STRUBE, W., SCHMEER, N. Clinical trials and field experiences with *Parapoxvirus* ovis based immunostimulants in livestock animal. In: SYMPOSIUM ABOUT IMMUNOMODULATORS OF THE WORLD ASSOCIATION VETERINARY MICROBIOLOGISTS, IMMUNOLOGISTS AND SPECIALISTS IN INFECTIOUS DISEASES, 13., 1994, Perugia. **Extract...** Perugia, 1994. p. 22-27.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of β -carotene. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 7, p. 617-635, 1989.

LANDAY, A. L.; GEORGE, S. K.; BRAY, R. A. Phenotyping cells of the immune system: methods and applications. In: COON, J. S.; WEINSTEIN, R. S. **Diagnostic flow cytometry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p. 55-77.

LEWIS, R. M.; SMITH, C. A.; GARFIELD, L. Kinetics of antibody synthesis to particulate and soluble antigen in newborn pups and adult dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 34, p. 235-240, 1973.

LINGEN, C.; ERNSTER, L.; LINDBERG, O. The promoting effect of lycopene on the non-specific resistance of animals. **Exp. Cell Res.**, v. 16, p. 385-393, 1959.

LUNEC, J. et al. Free-radical oxidation (peroxidation) products in serum and synovial fluids in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 8, p. 233-245, 1981.

LYDYARD, P.; GROSSI, C. Células envolvidas nas respostas imunes. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1994. p. 2.2-2.20, 1994.

MAKINODEN, T.; KAY, M. M. B. Age influence on the immune system. **Adv. Immunol.**, v. 24, p. 287-330, 1980.

MALONE, J. L. et al. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. **J. AIDS**, v. 3, p. 144-151, 1990.

MARTIN, J. R.; FAILLA, M. L.; SMITH JR.; J. C. β -carotene and lutein protect Hep G2 human liver cells oxidant-induced damage. **J. Nutr.**, v. 126, p. 2098-2106, 1996.

MAY, C. et al. Lymphocyte populations in the synovial membranes of dogs with rheumatoid arthritis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 31, p. 289-300, 1992.

MAYNE, S. T. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in human. **FASEB J.**, v. 10, p. 690-701, 1996.

McCURNIN, D.M.; POFFENBARGER, E.M. **Small animal physical diagnosis and clinical procedures**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. 221p.

MELAMED, M. R.; LINDMO, T.; MENDELSON, M. L. **Flow cytometry and sorting**. 2. ed. New York: Wiley Liss, 1990. 824 p.

MICHAL, J. J. et al. Modulatory effects of dietary beta-carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 1408-1422, 1994.

MOORE, T. Vitamin A and carotene. VI. The conversion of beta carotene to vitamin A in vivo. **Biochem. J.**, v. 24, p. 692-702, 1930.

MORIGUCHI, S. et al. Beta-caroteno supplementation enhances lymphocyte proliferation with mitogens in human peripheral blood lymphocytes. **Nutr. Res.**, v. 16, p. 211-228, 1996.

MORRISON, D. F. **Multivariate statistical methods**. 3. ed. São Paulo: Mc Graw-Hill, 1990. 350p.

MOSS, B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. **Science**, v. 252, p. 1662, 1991.

MURASKO, D. M.; WEINER, P.; KAYE, D. Deline in mitogen-induced proliferation of lymphocytes with increasing age. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 70, p. 440-448, 1987.

NORCROSS, N. L. Secretion and composition of colostrum and milk. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.181, p. 1057-1060, 1982.

OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K. Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 18, p. 753-758, 1996.

OLSON, J. A. Needs and sources of carotenoids and vitamin A. **Nutr. Rev.**, v. 52, p. 67-73, 1994.

ORMEROD, M. G. **Flow cytometry: a practical approach**. Oxford: Bios, 1994. 282 p.

OPDEBEECK, N. L. Mammary gland immunity. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 181, p. 1057-1060, 1982.

PARK, J. S. et al. Dietary lutein uptake by blood and leukocytes in domestic cats. **FASEB J.**, v. 13, p. A441.4, 1999.

PARK, J. S.; CHEW, B. P.; WONG, T. S. Dietary lutein from marigold extraxt inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. **J. Nutr.**, v. 128, p. 1650-1656, 1998.

PARKER, R. S. Absortion, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J.**, v. 10, p. 542-551, 1996.

PARKER, R. S. Carotenoids in human blood and tissue. **J. Nutr.**, v. 119, p. 101-104, 1989.

PAXTON, H. et al. Results of the fow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 52, p. 68-84, 1989.

POFFENBARGER, E. M. et al. Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p. 1221-1224, 1991.

PRABHALA, R. H. The effects of 13-cis retinoic acid and beta-carotene on cellular immunity in humans. **Cancer**, v. 67, p. 1556-1560, 1991.

QUIRKE, P.; DYSIN, J. E. Flow cytometry: Methodology and applications in pathology. **J. Pathol.**, v. 149, p. 79-87, 1986.

ROGERS, K. S. The lymphoid system. In: HOSKINS, J. D. **Veterinary pediatrics: dogs and cats from birth to six months**. Philadelphia: Saunders, 2001. cap. 15, p. 334-343.

REYNOLDS, H. Y., JOHNSON, J. S. Quantitation of canine imunoglobulins. **J Immunol.**, v. 105, p. 698-703, 1970.

SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 72, p. 143-155, 1999.

SELLON, R. K. et al. Changes in lymphocyte subsets with age in perinatal cats: late gestation through eight weeks. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 53, p. 105-113, 1996.

SHIFRINE, M. et al. Response of canine fetus and neonates to antigenic stimulation. **J. Immunol.**, v. 107, p. 965-970, 1971.

SIMPSON-MORGAN, M. W.; SMEATON, T. C. The transfer of antibodies by neonates and adults. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 16, p. 355-379, 1972.

SINKE, J. D. et al. Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 57, p. 13-23, 1997.

SONG, L. et al. Age-related effects in T cell activation and proliferation. **Exp. Gerontol.**, v. 28, p. 313-321, 1993.

STRASSER, A.; KALMAR, E.; NIEDERMÜLLER. A simple method for the simultaneous separation of peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells in the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 62, p. 29-35, 1998.

SZER, J. et al. Monoclonal antibody to human cytotoxic-suppressor T-lymphocytes cross-reacts with canine lymphocytes and inhibits cell-mediated lympholysis of canine cells. **Exp. Hematol.**, v. 13, p. 641-666, 1985.

TAURA, Y. et al. Changes in lymphoproliferation and DTH responses after vaccination immediately before surgery in puppies. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 57, p. 899-904, 1995.

THOMAN, M. L.; WEIGLE, W. The cellular and subcellular bases of immunosenescence. **Adv. Immunol.**, v. 46, p. 221-261, 1989.

THURNHAM, D. I. Carotenoids: function and fallacies. **Nutr. Soc.**, v.53, p. 77-87, 1994.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 482p.

TOMAN, M. et al. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 87, p. 321-326, 2002.

URQUHART, G. M. et al. Helminthologia veterinária. In:_____. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 3-120.

WATSON, D. L. Immunological functions of the mammary gland and its secretion-comparative review. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 33, p. 403-422, 1980.

WATSON, R. R. et al. Effects of beta-carotene on lymphocyte subpopulations in elderly humans: evidence for dose-response relationship. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. 90-94, 1991.

WEIBLEN, G. S.; WARNER, N. C., WAARNKE, R. A. "Acquired immunodeficiency" of blood stored overnight. **N. Engl. J. Med.**, v. 309, p. 793, 1983.

WEISS, D. J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 31, p. 72-82, 2002.

WHEELESS, L. L. Flow instrumentation and data analysis. In: COON, J. S.; WEINSTEIN, R. S. **Diagnostic flow cytometry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p. 17-34.

WENG, B. C. et al. β -carotene uptake by blood plasma and leukocytes in dogs. **FASEB J.**, v. 10, p. A 447, 1997.

WILLIAMS, D. L. Studies of canine leucocyte antigen: a significant advance in canine immunology. **Vet. J.**, v. 153, p. 31-39, 1997.

ZHANG, L.X.; CONEY, R. V.; BERTRAM, J. S. Carotenoids enhance gap junction communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 109-114, 1991.

8 ANEXOS

Anexo 1- Certificado de análise do carotenóide luteína

CERTIFICADO DE ANALISE

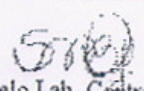
NOTA FISCAL N°

MATERIA-PRIMA: LUTEIN 10%		DATA DE ANALISE: 28/08/2002.
PROCEDÊNCIA: INDIA		
N° LOTE: IBPL/L/001		
DATA DE FABRICAÇÃO: MAIO/2002.		DATA DE VALIDADE: MAIO/2006.
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:		TEMPERATURA NAO MAIS QUE 30°C

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
DESCRIÇÃO*	Pó amarelo a laranja.	Pó laranja.
SOLUBILIDADE*	Muito pouco solúvel em água.	Conforme.
DENSIDADE APARENTE*	Informativo.	Sem compactação 0.29
	Informativo.	Com compactação 0.33
UMIDADE	≤ 10%	5.2%
XANTHOPHYLLS (LUTEIN)	≥ 10%	13.11%
CONTAGEM TOTAL MICROBIOLÓGICA	5000UFC/g	25UFC/g
E.Coli	Ausente.	Ausente.
Salmonella	Ausente.	Ausente.
Staphylococcus	Ausente.	Ausente.
Pseudomonas	Ausente.	Ausente.
METAIS PESADOS	< 10ppm	Conforme.
CHUMBO	< 4ppm.	Conforme.

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra.
 ** Fe = 7.62

CONCLUSÃO: Conforme especificações do fabricante.

 Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade Solange Magre B. Gebrim - CRF-GO N°.: 1796	 Responsável Técnico Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO N°.: 1829
--	--

Pharma Nostra Comercial Ltda.

FILIAL CAMPINAS: RUA ALBANO DE ALMEIDA LIMA, 236 - JD. GUANABARA CAMPINAS - SP - CEP 13073-130 PABX: (5519) 3241-3939 C.N.P.J.: 03.497.220/0003-22 INSC. EST.: 244.910.175.110	MATRIZ: RUA AQUIDABÁ, 1144 - MEIER RIO DE JANEIRO - RJ - CEP 20720-290 TEL: (5521) 2591-1555 - FAX: (5521) 2591-1693 C.N.P.J.: 03.497.220/0001-60 INSC. EST.: 77.002.782	FILIAL ANÁPOLIS: VIA PRIMÁRIA - 5D - QD. 10 - MOD. 01 - S.N° BAIRRO DAIA - ANÁPOLIS - GO - CEP 75133-600 TEL / FAX: (5562) 316-5226 C.N.P.J.: 03.497.220/0002-41 INSC. EST.: 10.336.118-9
--	--	---

D.D.G. MAGISTRAL 0800-7070706

Anexo 2- Hipóteses da interação entre grupos e momentos (1), diferença entre grupos em cada momento (4) e diferença entre momentos em cada grupo (5) testadas, estatísticas calculadas e comentários da análise de perfil dos leucócitos totais (μL) expressos na Tabela 1

Hipóteses	Estatística	Comentário
1	$F= 1,85; p < 0,05$	Existe interação significativa.
4	M1: $F= 0,46; p > 0,50$ M2: $F= 2,26; p > 0,10$ M3: $F= 0,54; p > 0,50$ M4: $F= 0,99; p > 0,10$ M5: $F= 1,34; p > 0,10$ M6: $F= 1,37; p > 0,10$ M7: $F= 0,47; p > 0,50$	GC= GL= GP GC= GL= GP GC= GL= GP GC= GL= GP GC= GL= GP GC= GL= GP GC= GL= GP
5	GC: $F= 15,43; p < 0,05$ GL: $F= 16,39; p < 0,05$ GP: $F= 15,00; p < 0,05$	(M1=M3) < (M4=M7); (M2=M5=M6) intermediários. (M1=M6) < (M2=M5=M7); (M3=M4) intermediários. (M1=M3=M4=M6=M7) < M2; (M5) intermediário.

Anexo 3- Hipóteses da interação entre grupos e momentos (1), diferença entre grupos no conjunto dos momentos (2); diferença entre momentos no conjunto dos grupos (3); diferença entre grupos em cada momento (4) e diferença entre momentos em cada grupo (5) testadas, estatísticas calculadas e comentários da análise de perfil dos linfócitos (μ L) correspondentes a Tabela 2

Hipóteses	Estatística	Comentário
1	$F = 0,46; p > 0,50$	Não foi constatada interação significativa.
2	$F = 0,19; p > 0,50$	Não foi constatada entre grupos.
3	$F = 7,23; p < 0,05$	(M1= M3) < (M2= M4= M5); (M6=M7) intermediários
4	M1: $F = 0,20; p > 0,50$ M2: $F = 0,10; p > 0,50$ M3: $F = 0,45; p > 0,50$ M4: $F = 0,72; p > 0,10$ M5: $F = 0,34; p > 0,50$ M6: $F = 0,82; p > 0,10$ M7: $F = 0,19; p > 0,50$	GL= GL=GP GL= GL=GP GL= GL=GP GL= GL=GP GL= GL=GP GL= GL=GP GL= GL=GP
5	GL: $F = 10,93; p < 0,05$ GL: $F = 10,64; p < 0,05$ GP: $F = 10,42; p < 0,05$	(M1=M3) < (M2=M4=M5); (M6=M7) intermediários (M1=M3=M6) < (M2=M4=M5) intermediários M1 < (M2=M4=M5); (M3=M6=M7) intermediários

Anexo 4- Hipóteses da interação entre grupos e momentos (1), diferença entre grupos em cada momento (4) e diferença entre momentos em cada grupo (5) testadas, estatísticas calculadas e comentários da análise dos percentuais das subpopulações de linfócitos T CD8, correspondentes a Tabela 4

Hipóteses	Estatística	Comentário
1	$F = 3,05; p < 0,05$	Existe interação significativa.
4	M1: $F = 0,82; p > 0,10$ M2: $F = 0,29; p > 0,50$ M3: $F = 1,05; p > 0,10$ M4: $F = 3,04; 0,05 < p < 0,10$ M5: $F = 0,68; p > 0,10$ M6: $F = 0,06; p > 0,50$ M7: $F = 0,13; p > 0,50$	GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP GC ≥ GL; (GP) intermediário GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP
5	GC: $F = 37,20; p < 0,05$	M1 < (M2=M5) < (M3=M4); (M6=M7) só diferem de M1; M1 < (M6=M7).
	GL: $F = 20,56; p < 0,05$	M1 < (M2=M3=M4=M5=M6=M7).
	GP: $F = 19,24; p < 0,05$	M1 < (M2=M3=M4=M5=M6=M7).

Anexo 5- Hipóteses da interação entre grupos e momentos (1), diferença entre grupos em cada momento (4) e diferença entre momentos em cada grupo (5) testadas, estatísticas calculadas e comentários da análise de perfil das relações das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8, correspondentes a Tabela 5

Hipóteses	Estatística	Comentário
1	$F = 3,36; p < 0,50$	Existe interação significativa.
4	M1: $F = 1,53; p > 0,10$ M2: $F = 0,04; p > 0,50$ M3: $F = 0,60; p > 0,10$ M4: $F = 0,47; p > 0,50$ M5: $F = 1,35; p > 0,10$ M6: $F = 0,30; p > 0,50$ M7: $F = 0,92; p > 0,10$	GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP GC= GL=GP
5	GC: $F = 13,82; p < 0,05$ GL: $F = 9,48; p < 0,05$ GP: $F = 17,37; p < 0,05$	M1> (M3=M4=M6=M7); (M2=M5) intermediários. (M1=M2)> M7; (M3=M4=M5=M6) intermediários. M1> M2> (M3=M4=M5=M6=M7).