

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD117⁺, CD45⁺ E DE
SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NO SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL E PERIFÉRICO DE SUÍNOS NEONATOS**

Cesaltina da Conceição Lopes Menete Tchamo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD117⁺, CD45⁺ E DE
SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NO SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL E PERIFÉRICO DE SUÍNOS NEONATOS**

Cesaltina da Conceição Lopes Menete Tchamo

Orientador: Prof . DR. Aureo Evangelista Santana

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2011

T249q Tchamo, Cesaltina da Conceição Lopes Menete
Quantificação de células CD117⁺, CD45⁺ e subpopulações linfocitárias
no sangue do cordão umbilical e periférico de suínos neonatos. / Cesaltina
Menete Tchamo. -- Jaboticabal, 2011
ix, 58 f. ; il ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Márcia Ferreira da Rosa Ferreira, Aparecido
Antônio Camacho, Raimundo Souza Lopes, Wanderson Adriano Biscola
Pereira

Bibliografia

1. Imunofenotipagem. 2. Citometria de fluxo. 3. Suínos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:636. 4

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CESALTINA DA CONCEIÇÃO LOPES MENETE TCHAMO – de nacionalidade moçambicana, natural de Jangamo-Inhambane, nascida em 18 de Junho de 1961. Filha de Abel Lopes Menete e de Joana Henriques. Concluiu o curso primário na Escola Paola Izabel, o ensino secundário na Escola Secundária Francisco Manyanga e o pré-universitário na faculdade de Educação da Universidade Eduardo Mondlane. Graduou-se em Medicina Veterinária pela faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Moçambique em julho de 1994. É docente de Medicina Interna desde julho de 1997 até a presente data. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária Tropical em novembro de 2007 pela Universidade de Pretória, África do Sul, com a dissertação intitulada “Evaluation of the pathogenicity of *Trypanosoma congolense* in goats from Matutuine, Mozambique”. Ingressou no doutorado em Medicina Veterinária, área de Patologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal em março de 2009.

Em todas as línguas do mundo existe um mesmo ditado:

“o que os olhos não vêem o coração não sente.”

Pois eu afirmo que não há nada mais falso do que isso;

*quanto mais longe, mais perto do coração estão os sentimentos dos quais nos
procuramos abstrair.....*

*“Quando estamos longe da terra amada, queremos guardar cada pequena
lembrança de nossas raízes, quando estamos distantes da pessoa amada, cada
pessoa que passa pela rua nos faz lembrar dela”.*

A dor da distância era tão forte que muitas vezes pensei em desistir.....

Muitas vezes me senti fraca, abandonada e impotente diante deste desafio.....

Mas.... a luz do pai me iluminou e conduziu-me a perseverar e perseverar

A finalização desta tarefa é mais uma obra do seu imenso poder pai

Eu te louvo por isto!

*Ao meu esposo **Jeremias Tchamo**, aos meus filhos **Ercília, Sílvia e Edson**, pela paciência, compreensão, incentivo e principalmente pelo carinho e amor demonstrados durante todos os momentos desta caminhada difícil para todos nós.*

*À minha mãe **Joana Henriques** que mesmo na dor da doença momento que ela mais precisa de mim, me incentivou a continuar e terminar este desafio.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço á Deus pelo dom da vida, pelo dom da perseverança, pela força e por me permitir mais esta realização.

A minha família, meu esposo, filhos, pais e a minha irmã pelo incentivo e, sobretudo amor e paciência.

Ao meu orientador Professor Dr. Aureo Evangelista Santana por me ter recebido e acima de tudo pela amizade, paciência, sabedoria e compreensão, possibilitando concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique e ao CNPq, por me terem concedido uma bolsa de estudos possibilitando a concretização deste projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal por ter me concedido a chance de realizar o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), por ter me concedido o auxílio à pesquisa permitindo a realização do meu projeto.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, Eugênio, Mônica, Matheus, pela grande colaboração nos procedimentos analítico-laboratoriais, pelos ensinamentos, pela amizade e pela convivência harmoniosa.

À minha grande amiga Silvana Ricardi Bicalho, pela grande amizade, ajuda acolhimento, pelas longas conversas e risadas.

À Izabella, por toda a amizade e por se juntar a mim para a concretização do seu projeto de iniciação científica e também do meu projeto de doutorado.

À Dra Roberta Ferro de Godoy por todo o apoio prestado durante a realização do projeto.

Às colegas Manú, Sofia e Mariana, Letícia e Andressa pelo convívio e por todo apoio prestado.

A todos os docentes da FCAV/UNESP - Campos de Jaboticabal pelos ensinamentos e acima de tudo pelo exemplo de amor à profissão.

Aos Professores Mirela Costa, Márcia Sobreira, Lizandra Amoroso e Andriago Barboza pelas contribuições imprescindíveis que me passaram na qualificação e aos professores Aparecido Camacho, Márcia Sobreira, Raimundo Lopes e Wandersson Biscola Pereira por fazerem parte da minha banca de defesa de tese.

A Fabiana Moreira, técnica do Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, campus de Ribeirão Preto, por toda atenção, paciência, grandes momentos de discussão para desvendar os mistérios do nosso CD117, pela análise e interpretação citométrica dos meus resultados.

Aos funcionários da granja de suínos da FCAV, José e Wilson, pela paciência, disponibilidade para ensinar e por todo o apoio prestado.

A Fernanda Celestino e todos os funcionários da granja de suínos A ESTIVA por terem posto ao meu dispor a granja, os animais e por toda a ajuda prestada para a realização deste trabalho.

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da
FCAV-UNESP em 17 de Junho de 2010 (protocolo n° 012421/10).**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIACÕES.....	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Aspectos gerais da hematopoiese	4
2.1.1 Fatores que regulam a hematopoiese	5
2.2 Fontes de células-tronco hematopoiéticas	6
2.2.1 Sangue do cordão umbilical	6
2.3 Métodos de identificação e quantificação de células hematopoiéticas.....	9
2.4 Aplicação da citometria de fluxo na hematologia de suínos.....	11
2.5 Valores Eritroleucométricos de Suínos ao nascimento	16
2.6 Modelos experimentais de estudo do sangue do cordão umbilical	17
2.7 Objetivos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Parcelas experimentais	20
3.2 Instalações	20
3.3 Coleta de material biológico	21

3.4 Métodos analíticos	23
3.4.1 Avaliação citofluorométrica.....	23
3.4.2 Avaliação eritroleucométrica	27
3.5. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Coleta de sangue do cordão umbilical	28
4.2 Variáveis citofluorométricas.....	28
4.3 Variáveis eritroleucométricas	32
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE ABREVIações

CD	“Cluster Designation”
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CSF	Fator estimulador de colônia
DECH.....	Doença de enxerto contra o hospedeiro
FACS.....	“Fluorescence Activated Cell Sorter”
FFRP	Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto
FCAV.....	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IL-.....	Interleucina
K2-EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético dipotássico
mL.....	Mililitro
µL.....	Microlitro
MCH-I.....	Complexo principal de histocompatibilidade de tipo I
MCH-II.....	Complexo principal de histocompatibilidade de tipo II

M-CSF.....	Factor Estimulador de Colônia de Macrófagos
NK	“Natural killers”
PE	Ficoeritrina
rpSCF	Fator de células-tronco recombinante
SCU	Sangue do Cordão Umbilical
SPI	Sangue periférico de suínos imediatamente ao nascimento
SP48	Sangue Periférico quarenta e oito horas após o nascimento
SSC.....	“Side Scatter”
TCR.....	Receptor de Célula T
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume Corpuscular Médio
WBC.....	White Blood Cells

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Preparo das amostras de sangue para análise citométrica.	24
Tabela 2. Valores médios e desvios padrão da contagem de células CD5 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , do obtido do Sangue do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.	31
Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para contagem global de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue colhido a partir do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática das veias umbilicais (duas) artérias Umbilicais (duas) e úraco no cordão umbilical de suíno (McGEADY et al., 2006).....	9
Figura 2. Porca contida em baia individual aguardando início de serviço do parto. Jaboticabal, SP, 2011.....	21
Figura 3. Ilustração do procedimento adotado para a coleta de sangue do cordão umbilical de neonato na porção justaplacentária da veia umbilical. Jaboticabal, SP, 2011.....	22
Figura 4. Representação gráfica de células por tamanho e complexidade (FSC/SSC) indicando <i>gate</i> de linfócitos a vermelho (P1), monócitos a verde (P2) e granulócitos a azul (P3) e respectivo histograma (A). Histograma do pan de linfócitos e respectiva distribuição em quadrantes CD4 ⁺ FITC e CD8 ⁺ PE (B). Jaboticabal, SP, 2011.....	26
Figura 5. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem de células CD117 ⁺ do sangue do cordão umbilical (SCU), sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.	29
Figura 6. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem de células CD45 ⁺ do Sangue do cordão umbilical (SCU), Periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e Periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.	30
Figura 7. Representação gráfica dos valores médios obtidos da quantificação das células CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , e CD8 ⁺ do Sangue do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011	31

- Figura 8.** Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem total de Hemácias, hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do sangue do cordão Umbilical (SCU), sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos n=48. Jaboticabal, SP, 2011.....33
- Figura 9.** Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem de reticulócitos do Sangue do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.....34
- Figura 10.** Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem total de Leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, Linfócitos e monócitos, do sangue obtido do cordão umbilical (SCU), sangue periférico obtido imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico obtido quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) em suínos n=48. Jaboticabal, SP, 2011.36

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD117⁺, CD45⁺ E DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E PERIFÉRICO DE SUÍNOS NEONATOS

RESUMO – Tendo em conta a importância do sangue do cordão umbilical (SCU) como fonte de células-tronco objetivou-se este estudo, visando quantificar células CD117⁺, CD45⁺ e subpopulações linfocitárias; e determinar os valores eritroleucométricos bem como a contagem de reticulócitos no sangue do cordão umbilical (SCU) e sangue periférico de suínos imediatamente ao nascimento (SPI) e quarenta e oito horas depois (SP48), utilizando-se de 48 amostras de SCU e periférico de neonatos. Comparando-se os grupos, a um nível de significância de 5% na quantificação de células CD117⁺ a marcação foi muito baixa presumivelmente porque o CD117 marca células em estágio de diferenciação. Pelo que se recomenda que mais estudos sejam feitos, combinando-o com o marcador da verdadeira célula-tronco. As contagens de células CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ por citometria de fluxo, no SCU e SPI foram inferiores às reportadas para o sangue periférico de adultos, indicando um componente imunológico imaturo. A proporção CD4:CD8, tanto para o SCU quanto para SPI, assim como SP48, demonstrou dominância das células TCD4⁺. Relativamente ao eritrograma, houve diferença significativa entre as variáveis nos grupos estudados, excetuando-se o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) que não variaram entre os grupos, SCU e SPI; a contagem de reticulócitos no grupo SP48 foi superior ao dos grupos SCU e SPI. No leucograma, todas as variáveis mostraram diferença significativa, excetuando-se a contagem de monócitos, que não variou entre os grupos, SCU e SPI. Já nos grupos SPI e SP48 foi observada diferença significativa na contagem de neutrófilos segmentados e monócitos, enquanto o total de leucócitos, neutrófilos bastonetes e linfócitos não diferiram.

Palavras-Chaves: imunofenotipagem, citometria de fluxo, suínos.

QUANTIFICATION CD117⁺, CD45⁺ CELLS AND LYMPHOCYTE SUBSETS IN UMBILICAL CORD BLOOD AND PERIPHERAL BLOOD SWINE NEONATES

ABSTRACT: Given the importance of Umbilical cord blood (UCB) as a source of stem cell, this study was aimed to quantify CD117⁺, CD45⁺ and lymphocyte subsets and determine the eritroleucometric values and the reticulocyte count in umbilical cord blood (UCB) and peripheral blood of piglets immediately at birth (PBI) and forty-eight hours late (PB48), using 48 samples of umbilical cord and peripheral blood of neonates. Comparing the groups at a significance level of 5 %, in the quantification of CD117⁺ cells, marking was very low presumably because CD117 mark cells in differentiation stage. It is recommended that more studies be done combining it with the marker of true stem cell marker. The lymphocyte subsets counts CD5⁺, CD4⁺ even CD8⁺ of UCB and PBI performed by flow citometry, were lower than those reported for peripheral blood of adult pigs, indicating an immature immunologic component. The ratio CD4:CD8 obtained in this trial, both UCB, PBI and PB48 showed dominance of CD4⁺ T cells lymphocytes. Regarding the erythrogram there was a significant difference between variables of groups with exception for mean corpuscular volume (MCV) mean corpuscular hemoglobin (MHC) and mean corpuscular hemoglobin concentration(MCHC) that did not vary between UCB and PBI groups; the reticulocyte count in PB48 group was higher than that of UCB and PBI groups. In the WBC, all variables showed significant differences, except for the number of monocytes, which vary between UCB and PBI groups. In PBI and PB48 groups there was no significant difference in the mature neutrophils and monocyte count, while the total leukocyte, band neutrophils and lymphocytes did not differ.

Keywords:immunophenotyping, flow citometry, pigs

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco são dotadas de variável plasticidade, as quais detêm propriedades de autorenovação e diferenciação, e que podem, por conseguinte, gerar diferentes tipos celulares. Em razão dessa plasticidade, as células-tronco podem ser definidas como sendo totipotenciais, pluripotenciais, multipotenciais, oligopotenciais e unipotenciais, sendo que as primeiras se caracterizam como células progenitoras, pois possuem capacidade de autorenovação e diferenciação ilimitadas, podendo dar origem às células de todos os tecidos do organismo (ODORICO et al., 2001).

As primeiras células-tronco adultas, reconhecidas como multipotenciais, foram as do sistema hematopoiético (LIANG; BICKENBACH, 2002), que derivam de uma única célula-mãe, denominada célula-tronco hematopoiética. Estas têm como característica principal a capacidade de autorenovação e de diferenciação em células sanguíneas morfo e funcionalmente distintas (GASPER, 2000).

Tem sido demonstrado que o sangue do cordão umbilical (SCU) e da placenta revelam-se muito ricos em células-tronco hematopoiéticas (LOCATELLI et al., 2006). E a presença de células progenitoras no SCU humano representa uma fonte alternativa ao transplante alogênico de medula óssea para reconstituição hematopoiética (VILMER et al., 1992; WAGNER et al., 1992).

Outras células usadas com potencial terapêutico são as células-tronco embrionárias, em virtude das suas potencialidades de auto-renovarão e de diferenciação, em praticamente todos os tecidos, órgãos e sistemas em geral. Entretanto o seu uso tem sido objeto de amplas discussões e controvérsias, onde se verifica que há algumas correntes científicas que olham para tal possibilidade como uma esperança para o tratamento de inúmeras doenças, enquanto outras, porém, cerceadas por questões de cunho religioso e mesmo éticas, vêem no uso das células-tronco embrionárias um atentado contra a vida (PRANKE, 2004). Tal fato vem

ensejando ampla possibilidade para o estabelecimento de modelos de estudo a partir de células-tronco hematopoiéticas (adultas), em animais. Neste particular, o estudo experimental, utilizando-se de suínos domésticos (*Sus scrofa*) se revela bastante válido por transpor tais barreiras. E, também, porque o suíno se revela como um modelo experimental promissor e útil nas pesquisas em alo e xenotransplantes, com vistas à reconstituição/regeneração tecidual, particularmente em virtude da grande similaridade com o homem no tamanho dos órgãos e características fisiológicas (SACHS, 1994; COOPER et al., 2002).

A imunofenotipagem com recurso aos anticorpos monoclonais permite a classificação e quantificação de células sanguíneas. Anticorpos monoclonais, conjugados com compostos fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), podem ser incubados com as células a serem analisadas, permitindo a identificação e quantificação citofluorométrica de tais células (GRINDEM, 1996).

A citometria de fluxo é um recurso emergente na medicina veterinária, que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001).

Este estudo foi realizado, levando-se em conta a utilidade do suíno como modelo animal para pesquisas biomédicas, bem como a importância do SCU como fonte potencial para transplante. O objetivo foi quantificar células CD117⁺, CD45⁺, CD8⁺, CD5⁺ e CD4⁺ e avaliar os valores eritroleucométricos e a porcentagem de reticulócitos no SCU, além de comparar os valores obtidos com os do sangue periférico de suínos neonatos.

2.REVISÃO DA LITERATURA

As células-tronco podem ser classificadas, em função da sua origem ou da sua capacidade de diferenciação. Assim temos as células originárias do embrião (células-tronco embrionárias), que podem dar origem a todos os tecidos do organismo, incluindo

a placenta e membranas fetais. Essas células, em função da sua capacidade de diferenciação, são designadas células-tronco totipotentes. A divisão das células totipotentes resulta na formação das células pluripotentes, que são mais limitadas com relação à sua plasticidade e que diferem das células totipotentes por sua incapacidade de dar origem à placenta e envoltórios fetais. À medida que as células pluripotentes se especializam, passam a constituir tecidos específicos, e o seu potencial passa a ser ainda mais restrito, materializando-se como células-tronco multipotentes, ou células-tronco adultas, cuja função é a reparação e manutenção teciduais (SCHWINDT, et al., 2005; SELL, 2004).

Uma das fontes mais usadas para a extração de células-tronco adultas é a medula óssea, amplamente estudada face ao seu uso clínico em transplantes. Nesse tecido, encontram-se, entre outras, as células-tronco hematopoiéticas, que são responsáveis por toda a progênie granulocítica e mielocítica (SCHWINDT et al., 2005).

A célula-tronco hematopoiética é definida como uma célula com grande capacidade de autorenovação e proliferação. Possui também a capacidade de diferenciar-se em progenitores hematopoiéticos de todas as linhagens celulares (QUESENBERRY & COLVIN, 2001)

As células-tronco hematopoiéticas têm origem mesenquimal e, durante o período de vida intrauterina, são encontradas no saco vitelino embrionário e, posteriormente, deslocam-se, por via hematogênica, para o fígado, baço, linfonodos e timo fetal (NAKAGE & SANTANA, 2006). Na metade do período de vida intrauterina, a hematopoiese passa a ocorrer na medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoiético no terço final da vida intrauterina, produzindo granulócitos, monócitos, eritrócitos, megacariócitos e alguns linfócitos. A hematopoiese persiste na medula óssea durante a vida adulta (JAIN, 1986; SANTANA, 2000).

Embora o fenótipo exato das células-tronco hematopoiéticas seja desconhecido, imunologicamente comportam-se como $CD34^+CD38^-$ e, morfológicamente, assemelham-se às células mononucleares, principalmente, a pequenos linfócitos, tendo alta relação núcleo-citoplasma, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico destituído de grânulos (GASPER, 2000).

As células-tronco hematopoiéticas primitivas e as células progenitoras expressam a glicoproteína CD34 (JIN et al.,2000) e co-expressam o fator de crescimento de células-tronco, c-kit (CD117) (SIMMONS et al., 1993) e Thy 1 (CRAIG et al., 1993). Outra característica das células-tronco primitivas é a não expressão de HLA-DR e CD38 (QUESENBERRY & COLVIN, 2001).

2.1 Aspectos gerais da hematopoiese

O sistema hematopoiético é altamente organizado, responsável pela produção das células sanguíneas. O controle da proliferação, diferenciação e maturação dessas células é feito através de uma complexa interação molecular das células com o microambiente da medula óssea. Esse microambiente complexo produz glicoproteínas solúveis, genericamente chamadas de citocinas, que controlam a mitose e a diferenciação das células hematopoiéticas (GASPER, 2000).

Hematopoíese é o processo pelo qual as células sanguíneas proliferam, diferenciam e amadurecem morfofuncionalmente na medula óssea. Nesse processo, são produzidas hemácias, plaquetas e leucócitos a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, que residem na medula óssea, e possuem a capacidade peculiar de produzir todos os diferentes tipos de células sanguíneas maduras em condições apropriadas (LOWELL, 2001).

A hematopoíese pós-natal é realizada essencialmente no seio da medula óssea, cuja celularidade inclui células-tronco hematopoiéticas, células precursoras (blastos), células sanguíneas morfofuncionalmente maduras e tecido de sustentação da hematopoiese (microambiente hematopoiético), localizado nas cavidades medulares dos ossos (SANTANA, 2000). A diferenciação das células-tronco hematopoiéticas pluripotenciais em células progenitoras unipotenciais “comprometidas”, e estas últimas em precursores clonais morfológicamente reconhecíveis e suas progênes, é influenciada por uma variedade de fatores regulatórios, que agem em diferentes níveis do desenvolvimento celular, caracterizando a teoria monofilética da origem do sangue (SANTANA, 1988).

2.1.1 Fatores que regulam a hematopoíese

A proliferação e a diferenciação celular são controladas por um grupo de glicoproteínas, designadas fatores de crescimento hematopoiético (McNIECE & BRIDDELL, 2001). Além desses fatores, a autorenovação, proliferação, diferenciação, *homing* e mobilização de progenitores hematopoiéticos são regulados por um complexo mecanismo que envolve o microambiente da medula óssea (GASPER, 2000). Esse microambiente complexo produz glicoproteínas solúveis genericamente chamadas de citocinas, que controlam a mitose e a diferenciação das células hematopoiéticas (ANJOS et al., 2000).

A célula indiferenciada pluripotente expressa um receptor de membrana de tirosinaquinase, identificado como o produto proteico do oncogene celular, c-kit, e a citocina que interage com o receptor, designada ligante do c-kit e também denominada “fator de células indeferenciadas” (ABBAS et al., 1998), que por sua vez é sintetizado por células do estroma da medula óssea e estimula diretamente as células-tronco hematopoiéticas a entrar para o ciclo celular. O fator de célula-tronco, sozinho, tem um efeito limitado na hematopoíese, entretanto, na presença de outras citocinas, aumenta o tamanho e o número de colônias de células progenitoras (GASPER, 2000).

Outros fatores reguladores da hematopoíese são os fatores estimuladores de colônia (CSF), que atuam sobre células da medula óssea em diferentes etapas da maturação e promovem, preferencialmente, o desenvolvimento de colônias de diferentes linhagens (ABBAS et al., 1998; GASPER, 2000). Fatores estimuladores de colônia (CSF) de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), de granulócitos (G-CSF) e macrófagos (M-CSF), atuam sobre uma estreita faixa de células alvo (precursores hematopoiéticos) (DEAN, 2000; SANTANA 2000).

Entre outras citocinas estimuladoras de colônia, a IL-9 sustenta o crescimento de algumas linhagens de linfócitos T e progenitores de mastócitos, derivados da medula óssea, e a IL-11 estimula a megacariopoiese (ABBAS et al., 1998), e poetas como

eritropoetina, a trombopoetina, estimulam as células progenitoras de linhagem eritróide e megacariocítica, respectivamente, a proliferar e se diferenciar formando células maduras (GASPER, 2000).

2.2 Fontes de células-tronco hematopoiéticas

Até recentemente, a principal fonte de células-tronco hematopoiéticas para transplante era a medula óssea (MARMONT, 1993). Atualmente, está bem estabelecido que as células-tronco podem ser obtidas do sangue periférico, entretanto, a utilização dessa via para a obtenção de células-tronco para transplante medular exige mobilização prévia destas da medula óssea para o sangue (BAY et al., 2006). Isso é feito através da administração de fator estimulante de colônia (CSF) (BAY et al., 2006; SCHMITZ et al., 1996).

Nos últimos anos, o sangue do cordão umbilical tem sido clinicamente investigado como fonte alternativa para transplante alogênico, em pacientes que não apresentam HLA-compatível (LU et al., 1996; CAIRO et al., 1997).

2.2.1 Sangue do cordão umbilical

A eficácia das células-tronco do SCU para transplante foi inicialmente demonstrada em modelos animais, com o uso de camundongos letalmente irradiados, cuja reconstituição completa da medula foi alcançada após infusão de SCU (BROXMEYER et al., 1989). Esses resultados levaram à primeira experiência bem sucedida de transplante de SCU em uma criança com anemia de Fanconi, na qual foi usado SCU de sua irmã para realizar o transplante (GLUCKMAN et al., 1989).

O SCU tem sido utilizado como uma fonte alternativa de células-tronco hematopoiéticas, principalmente em crianças, e cada vez mais em adultos para o tratamento de doenças hematológicas, síndromes de imunodeficiência congênita, desordens metabólicas e doenças autoimunes (ROCHA et al., 2004; LAUGHLIN et al., 2004; YAO et al., 2004) .

Outras vantagens do uso do SCU, como fonte de células-tronco hematopoiéticas sobre a medula óssea e sangue periférico, são a sua disponibilidade de oferta, uma vez que o mesmo é muitas vezes descartado após o parto ou armazenado em bancos de sangue de cordão umbilical humano (ALKINDI & DENNISON, 2011). Ademais, o uso do SCU torna-se potencialmente vantajoso em decorrência do alto número e qualidade de células-tronco hematopoiéticas e da relativa imaturidade. Portanto, maior tolerância imunológica do SCU (EAPEN, 2007) e, como consequência, induzem a uma menor incidência da doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH)(VILMAR et al., 1992; ROCHA et al., 2001).

Nesse contexto da DECH, Cookson & Reen (2003) referem que células T neonatais e células *natural killers* (NK) também podem ser parcialmente responsáveis pela baixa incidência da DECH e desempenham um papel importante na proteção do recém-nascido contra a infecção.

Coleta do sangue do cordão umbilical

O SCU pode ser usado como fonte de células-tronco hematopoiéticas para transplante. O sucesso do transplante é altamente correlacionado com o número de células nucleadas e células CD34⁺ no SCU (MANEGOLD et al., 2008). Vários métodos de coleta de SCU humano têm sido propostos de modo a maximizar a quantidade de células obtidas (WONG et al., 2001). Diretrizes internacionais recomendam um padrão de 2×10^7 de células/kg para adultos e $3,7 \times 10^7$ células /kg para crianças (MANCINELLI et al 2006).

O SCU é coletado por intermédio da venipunção da veia umbilical placentária, logo após o clampeamento do cordão umbilical com a placenta *in loco*, ou após a dequitação placentária, e transferido para uma bolsa coletora universal contendo 100 UI/mL de heparina como anticoagulante, resultando em um número maior de células nucleadas por mL de SCU, nas amostras colhidas com a placenta *in loco* quando comparado com o número de células depois da dequitação placentária ($13,6 \times 10^6$ /mL vs $13,0 \times 10^6$ /mL) (SURBEK et al., 2000; WONG et al., 2001).

O volume do SCU é um fator a ser considerado, porque um volume reduzido leva à perda substancial de células progenitoras do SCU. Cairo et al. (1997) e Surbek et al. (2000) afirmaram que o volume do SCU é mais elevado na coleta efetuada antes da dequitação placentária. Por outro lado, a contaminação bacteriana é outro fator a ser levado em conta Bertolini et al. (1995) reportaram uma menor contaminação bacteriana na coleta de SCU feita por venipunção da veia umbilical placentária (3,3%), com a placenta *in situ*, comparado à coleta do SCU após a dequitação placentária (12,5%).

Características anatômicas do cordão umbilical de suíno

O cordão umbilical é a haste de conexão entre o feto e a placenta. O corpo do cordão consiste de duas artérias umbilicais, duas veias umbilicais, o úraco, e o vestígio do saco vitelino, os quais se encontram envoltos por tecido conjuntivo fetal. Assim que o cordão umbilical emerge do corpo, os seus ramos divergem e continuam no pólo oposto do saco coriônico. A artéria umbilical, presente no cordão umbilical, desce em espiral no cordão ao longo do úraco. Ela imite ramos para o saco amniótico e termina na membrana cório-alantoidea. Em suínos, a veia umbilical funde-se na porção amniótica do cordão (Figura 1) (McGEADY et al., 2006).

O cordão umbilical de suíno, tem um comprimento de 20 a 25 cm e se rompe assim que o leitão atravessa o canal fetal. O ponto de rompimento é a 3 - 5cm do umbigo (McGEADY et al., 2006).

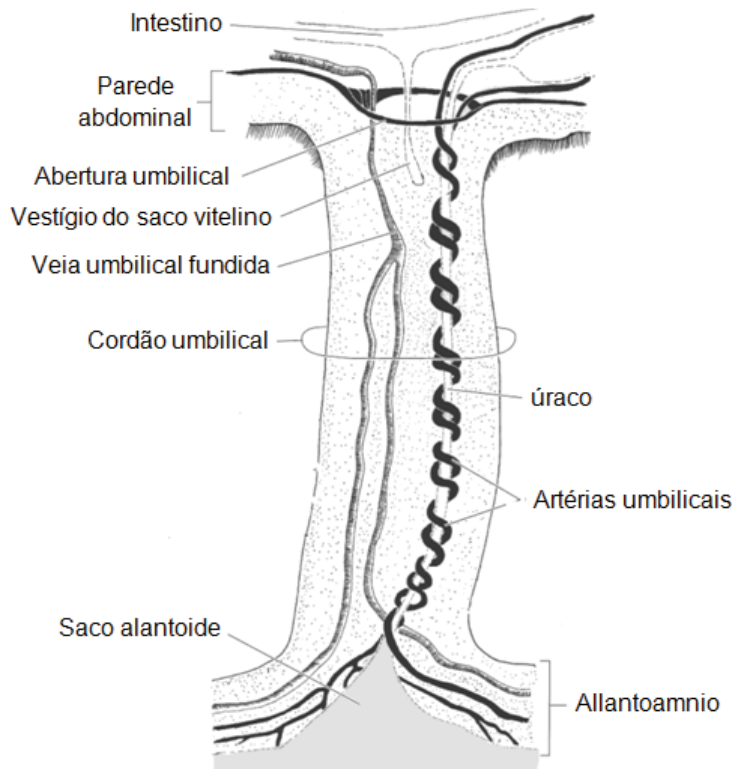


Figura 1. Representação esquemática das veias umbilicais (duas) artérias Umbilicais (duas) e úrico no cordão umbilical de suíno (McGEADY et al., 2006).

2.3 Métodos de identificação e quantificação de células hematopoiéticas

As células do sistema imunológico têm, em suas superfícies, em seu citoplasma ou núcleo, centenas de moléculas específicas para o seu estágio particular de desenvolvimento e estado funcional.

O processo de separação de populações distintas de células com base nos tipos de antígeno expressos em uma célula é referido como imunofenotipagem (ROITT et al., 2003). Para detectar esses antígenos, são usados anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromo, e as células são analisadas por citometria de fluxo que as categoriza por granulocidade, tamanho e intensidade de fluorescência. Um padrão internacional de nomenclatura é usado para classificar a maioria dos anticorpos de acordo com os antígenos que detectam. Cada categoria é chamada *cluster* de diferenciação (CD) e é numerado. O termo CD (*Cluster Designation* = denominação de grupamento) é utilizado

para denominar os anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios e em diferentes partes do mundo, contra antígenos leucocitários humanos (ROITT et al., 2003).

Anticorpos monoclonais são marcadores de escolha em virtude da sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN et al., 1994).

Para classificar os anticorpos monoclonais de diversos animais domésticos, incluindo cães (COBBOLD; METCALF, 1994), suínos (SAALMULLER, 1996), equinos (LUNN et al., 1996) e ruminantes (NAESSENS et al., 1997), alguns *workshops* têm sido organizados para designar a estes anticorpos uma nomenclatura correspondente à humana.

A citometria de fluxo é a aplicação das técnicas de imunofluorescência na identificação de determinadas células em suspensão, ou seja, na identificação de antígenos em células vivas (BENDER & MUHLEN, 2009). Por citometria de fluxo, as células a serem analisadas se acoplam a um fluorocromo, diretamente ou através de uma proteína que, geralmente, é um anticorpo monoclonal que reconhece um epítipo específico da célula. Posteriormente, as células suspensas em uma solução fisiológica são injetadas em um sistema de fluidos para serem expostas individualmente a um jato de luz focalizado (*laser*) o qual, ao incidir com cada célula, se desvia e essa mudança de direção é registrada por detectores especiais. Os fluorocromos (ex: isoticianato de fluoresceína, FITC e ficoeritrina, PE) são moléculas que, ao serem excitadas, emitem luz a um determinado comprimento de onda que é registrada por fotodetectores. Este método permite analisar um elevado número de células (10.000 a 50.000) para cada anticorpo monoclonal, e possibilita um registro computadorizado dos resultados (LOWELL et al., 2001).

Nas coletas das amostras de sangue para citometria de fluxo, o anticoagulante recomendado é o ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K2-EDTA), o qual apresenta vantagens sobre os demais, pois proporciona uma boa separação das distintas populações leucocitárias e permite que as amostras possam ser analisadas satisfatoriamente dentro de um período de 24 horas (PAXTON et al., 1989).

Byrne et al. (2000) referiram que a análise dos linfócitos, assim como de outros leucócitos pela citometria de fluxo, deve ser precedida pela contagem total e diferencial dos leucócitos. Os valores absolutos para subpopulações linfocitárias são obtidos com base nas porcentagens da citometria, contagens globais dos leucócitos e fórmula leucocitária relativa dos linfócitos.

2.4 Aplicação da citometria de fluxo na hematologia de suínos

Embora muitos anticorpos monoclonais específicos para suínos já tenham sido caracterizados, o estudo, a quantificação e a caracterização de células progenitoras hematopoiéticas de suínos têm sido dificultadas pela falta de reagentes específicos. (PEREZ et al. 2007).

Anticorpos monoclonais reativos com leucócitos suínos foram relatados, inicialmente, em 1984 (PESCOVITZ et. al., 1984; JONJIK; KOSZINOWSKI, 1984). Durante o primeiro *workshop* internacional para grupos de diferenciação de antígenos em leucócitos de suínos (*First International Swine Cluster of Differentiation (CD) Workshop*), (LUNNEY et al., 1994), vinte diferentes grupos de diferenciação (CD) de antígenos reconhecidos por diferentes anticorpos monoclonais foram identificados. Durante o segundo *workshop* suíno (*Second International Swine Cluster of Differentiation - CD Workshop*), realizado em 1995, mais 176 anticorpos foram caracterizados, bem como as regras de CD suíno compatibilizadas com as de humano e ruminante (SAALMULLER et. al., 1998).

Apesar dos avanços feitos na caracterização e agrupamentos de anticorpos monoclonais de suínos, o conhecimento do seu sistema hematológico permanece incompleto, particularmente em consequência da falta de marcadores para progenitores hematopoiéticos (SUMMERFIELD et al, 2003).

Caracterização e quantificação de células-tronco hematopoiéticas

Em camundongos e humanos, células-tronco hematopoiéticas podem ser eficientemente isoladas do sangue periférico, do SCU, assim como da medula óssea,

usando-se anticorpos monoclonais contra CD34 ou CD117 (NEU et al., 1996). O reagente CD34 não se encontra ainda disponível para estudo das células-tronco de suínos.

Perez et al. (2007) reportaram e caracterizaram um novo anticorpo monoclonal anti-c-Kit (CD117) 2B8/BM, c-kit para suínos. A reatividade desse anticorpo é restrita a uma pequena população de células adultas da medula óssea.

Com esse novo anticorpo monoclonal, foram caracterizadas células hematopoiéticas de suíno, ligante c-kit positivas, julgando-se que seus achados iniciais poderão facilitar o isolamento dessas células e, posteriormente, testar o seu potencial no tratamento de uma variedade de condições clínicas. Células hematopoiéticas c-kit⁺ foram analisadas e classificadas, utilizando-se de um fator de células-tronco recombinante (rpSCF) (SUMMERFIELD et al., 2003; LE GERN et al., 2003).

Métodos padronizados, reproduzíveis para isolamento de células c-kit⁺, não estão ainda bem estabelecidos. Em contraste, há uma variedade de métodos para isolamento de células CD34⁺ (NEU et al., 1996). Essas células possuem capacidade de reconstituição da medula óssea e são amplamente aceitas como células-tronco hematopoiéticas ou células hematopoiéticas progenitoras (BERENSON et al., 1988).

A população de células CD34⁺ exibe uma extraordinária heterogeneidade na co-expressão de antígenos. Diferentes abordagens de isolamento e cultura de células tornaram possível a definição de distintas populações de células CD34⁺ entre elas (CD34⁺CD117⁺), que são células hematopoiéticas primitivas (IKUTA & WEISSMAN, 1992; GUNGI et al., 1993) enquanto células da medula óssea de humanos CD 34⁺/c-kit^{high} exibem principalmente potencial proliferativo. Unidades formadoras de colônias, células progenitoras mais imaturas estão na população CD34⁺/c-kit^{low} (GUNGI et al., 1993). Essas observações indicam que progenitores hematopoiéticos mais primitivos e em estágio dormente do ciclo celular são CD34⁺/c-kit^{low}, e as que se encontram em ciclo celular ativo são CD34⁺/c-kit^{high} (LAVIER et al., 1995). Sendo assim, para a quantificação de células CD117 é imprescindível a presença do marcador de células-tronco específico para suínos de modo a permitir observação do grau de co-expressão do CD117.

A falta do marcador CD34 específico para células sanguíneas de suínos limita a quantificação de células-tronco CD117⁺ dentro do universo CD34⁺, permitindo apenas uma identificação de células CD117⁺ e o seu valor relativo na amostra que é dado pelo citômetro.

Os diversificados ensaios referentes à expressão do CD117 têm sido encontrados em diferentes freqüências, 81% no SCU, 72% e 64% em células CD34⁺ da medula óssea, e sangue periférico, respectivamente D'arena et al., (1996) e Sakabe et al., (1997), encontraram no sangue periférico mobilizado três distintas populações de células CD34⁺, c-kit^{high}, c-kit^{Low}, c-kit⁻. Estudos mais recentes sugerem que precursores mais primitivos expressam c-kit em baixo nível (XIAO et al., 1999) ou não expressam (SAKABE et al., 1998).

Caracterização e quantificação de células CD45⁺

Os leucócitos dos mamíferos compartilham um antígeno que está presente em todas as células nucleadas de origem mielóide e está ausente nos eritrócitos maduros, o antígeno leucocitário comum CD45 (BINNS et al., 1995). Sendo assim, é o marcador de escolha para a imunofenotipagem de leucócitos e de outras linhagens celulares do sangue (TERZIK et al., 2002) foi testado durante os *workshops* de suíno e caracterizado como uma glicoproteína de superfície que se expressa em todas as células T maduras e em pequena proporção nos linfócitos B (HAYAKAWA; HARDY, 1988)

O anticorpo anti-CD45 é geralmente utilizado em hematologia veterinária para classificação celular e, em especial, para qualificação e quantificação de variedades leucocitárias (WEISS, 2004). O antígeno CD45 se expressa com diferentes intensidades na superfície das células sanguíneas (GRINDEM, 1996; WEISS, 2004) e configura-se como uma família de glicoproteínas de 190 a 220kDa, encontrada em todas as células hematopoiéticas, exceto nas hemácias maduras (TIZARD, 2002).

O antígeno CD45 pode incluir mais de oito isoformas, em razão da emenda variável de três exons (A, B e C) localizados perto do terminal 5' do mRNA. No caso da

espécie suína, predominam três isoformas que incluem CD45R0, CD45RC e CD45RAC (SCHNITZLEIN; ZUCKERMANN, 1998). Tais isoformas em células hematopoiéticas de suínos apresentam pesos moleculares de 190, 210, e 226 kDa, respectivamente (ZUCKERMANN et al., 1998). As isoformas são particularmente importantes para o desenvolvimento e diferenciação do linfócito T (PEACKMAN; VERGANI, 1999).

De acordo com Nakage et al. (2005) os leucócitos podem ser analisados no sangue total com anticoagulante ou podem ser isolados pelo uso da centrifugação por gradiente de densidade. O sangue total evita as alterações celulares associadas à centrifugação por gradiente de densidade. E as variações no tamanho e na granularidade interna permitem a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos.

Caracterização e quantificação de subpopulações linfocitárias

A célula T é caracterizada pela presença do seu receptor de antígeno, designado por TCR, que pode ser heterodimérico com dois peptídeos ligados por pontes dissulfeto α e β (que reconhece fragmentos processados do antígeno, ligados às moléculas do MHC-I ou MHC-II); e o outro, que consiste em polipeptídeos γ e δ (que podem reconhecer antígenos não peptídicos independentes do MHC) (TANAKA et al., 1994; ROITT et al., 2003). Juntamente com o TCR, encontra-se a presença constitutiva de um complexo de moléculas, denominada CD3 e envolvido na transdução de sinais de ativação antígeno-específico através do TCR. (ABBAS; LICHTMAN, 1998; PEACKMAN & VERGANI, 1999).

SAALMULLER et al. (1994a) caracterizaram a molécula CD5 de suíno como sendo uma glicoproteína monomérica e revelaram que a maioria destas células pertencia à linhagem de linfócitos T, enquanto 10 a 30% dos linfócitos B expressam CD5+ em baixa densidade. E o antígeno CD4+ como um polipeptídeo que interage com células apresentadoras de antígenos, ligadas as moléculas do MHC de classe II. É expressa em 50% dos timócitos e em uma parte substancial dos linfócitos T do sangue periférico (SAALMULLER et al., 1994b). Já o antígeno CD8+ é uma proteína

homodimérica $\alpha\alpha$ assim como heterodimérica $\alpha\beta$, presente na superfície das células T de suíno em alta ($CD8^{\text{high}}$) e baixa ($CD8^{\text{low}}$) densidades (SALMULLER et al., 1994c).

As especificidades dos anticorpos monoclonais para suínos, $CD4^+$ e $CD8^+$, foram previamente descritas (PESCOVITZ et al., 1984) e foram caracterizadas durante o primeiro *workshop* internacional suíno (CD workshop) (LUNNEY et al., 1994).

A fenotipagem de linfócitos do SCU é facilmente realizada através da citometria de fluxo, técnica que quantifica células coradas com reagentes fluorescentes específicos (SCHUMACHER & BURKHEAD, 2000).

Nakage et al., (2005) refere que para a quantificação de linfócitos é importante e ideal que as subpopulações linfocitárias T $CD4$ e $CD8$ sejam preservadas, enquanto outros componentes celulares, que possam interferir na identificação das subpopulações linfocitárias, sejam eliminados. De acordo com Faldyna et al. (2001), a lise de hemácias do sangue total é o procedimento de escolha para tal propósito.

Na maioria das espécies de mamíferos domésticos, as células T constituem a população predominante. Em suínos, essa população corresponde a 45 a 57%, dos quais 41% são células $CD4^+$ (T- auxiliares) e 16 a 24% são células $CD8^+$ (T- citotóxicas) (PESCOVITZ et al., 1998; LI et al., 2001; TIZARD, 2002). Whittal & Parkhouse (1997) reportaram (23 a 49%) de células $CD4^+$ e (19 a 39%) de células $CD8^+$ no sangue periférico de suínos adultos. Outros estudos relativos à quantificação imunofenotípica de células T do sangue periférico de suínos demonstraram que a porcentagem de células T $CD8^+$ aumenta gradativamente com a idade, levando a um decréscimo na razão $CD4:CD8$. (JONJIC & KOSZINOWSKI, 1984; PESCOVITZ et al., 1985; JOLING et al., 1993).

O sistema imune suíno apresenta certas peculiaridades e é o único no qual a expressão de antígenos $CD4$ e $CD8$ define quatro subpopulações de linfócitos T extratímicos (SAALMULLER et al., 1989). Além dos fenótipos clássicos de linfócitos $CD4^+CD8^-$ (T- auxiliares), e células $CD4^-CD8^+$ (T- citotóxico), linfócitos T $CD4^-CD8^-$ e $CD4^+CD8^+$ são proeminentes na circulação, assim como no pool de linfócitos T tissulares (SAALMULLER et al., 1989). Podem ser encontrados entre o total de linfócitos T, 10-60% são células T $CD4^+$ e $CD8^+$ (duplamente positivos) (PESCOVITZ et

al., 1994). Zuckerman & Husmann (1996) reportaram que este subconjunto de linfócitos T representa <2% do total dos linfócitos em suínos com menos de uma semana de idade e aumenta gradualmente com a idade até 35% entre 45 e 54 meses.

2.5 Valores Eritroleucométricos de Suínos ao nascimento

A hematologia de suínos não é freqüentemente realizada devido essencialmente à dificuldade na coleta e ao baixo valor intrínseco do animal individual. Há alguns intervalos de referência publicados, entretanto o intervalo de muitos deles é bastante amplo. Essa variabilidade pode ser devida a vários fatores como sexo, raça, dieta, idade, gestação, lactação pelo que a interpretação dos dados de hematologia de suíno requer a consideração destes fatores (ELBERS et al., 1992; DUBREUIL et al., 1993; YEH et al., 1994).

O estresse é outro fator que induz a alterações no hemograma de suíno. Elberts, (1992) e Dubreuil, (1993), referem que o estresse pode levar a um aumento da contagem total de leucócitos, bem como de neutrófilos acrescido de um aumento significativo da concentração de hemoglobina e hematócrito.

Miller et al., (1961), referindo-se ao fator idade, relatam em suínos nos primeiros dias de nascimento uma baixa na ordem de 30 a 38% na contagem de células vermelhas, hematócrito e concentração da hemoglobina como resultado da expansão do volume do plasma.

Dados da literatura indicam que o suíno é um animal susceptível ao desenvolvimento de anemia por privação de ferro. Essa susceptibilidade é devida essencialmente ao baixo estoque de ferro fetal (SVOBODA & DRABEK, 2005), uma baixa reserva de ferro ao nascimento; baixa transferência de ferro da mãe para os leitões através da placenta (ALLEN, 2005). Ademais, rápido crescimento dos leitões, tamanho aumentado da leitegada e inadequados níveis de ferro no leite da porca (SVOBODA & DRABEK, 2005). A falta de suplementação de ferro, nos primeiros dois dias após o nascimento, induz a um estado pré - anêmico com redução até á linha

limite do valor de normalidade do total de hemácias, porcentagem de hematócrito e concentração da hemoglobina (LIPINSKI et al., 2010).

Em relação ao leucograma de suínos, o total de leucócitos aumenta ao longo da vida fetal, consistindo principalmente de neutrófilos (THORN, 2000).

Valenga et al. (1986) e Egeli et al. (1998) referem que, ao nascimento, a contagem média de neutrófilos ($6,56 \times 10^9/\mu\text{L}$) representa 65 a 70% dos leucócitos, e a contagem média de linfócitos ($1,77 \times 10^9/\mu\text{L}$) representa cerca de 20%. Na primeira semana, neutrófilos e linfócitos estão em igual quantidade e, por volta dos 10 dias de idade, o número de linfócitos supera o dos neutrófilos. A ingestão de colostro na idade do desmame afeta a contagem de eritrócitos e leucócitos, assim como a dinâmica das células fato verificado também por Santana (1982). Já, em porcas adultas Sipos et al. (2011) referem a uma proporção de linfócitos de $44,7 \pm 10,2\%$ e de neutrófilos de $41,6 \pm 11\%$.

Relativamente à contagem de reticulócitos, Thorn (2000) reportou que porcentagem máxima de reticulócitos é de 6,5% na metade do período de vida intrauterino, mas reduz para 1% por volta do nascimento.

2.6 Modelos experimentais de estudo do sangue do cordão umbilical

Em um estudo realizado em humanos por Walka et al. (1998), no qual foram colhidas 123 amostras de SCU de indivíduos saudáveis nascidos a termo, foram obtidos os seguintes resultados: Eritrócitos – $4,6 (3,9-5,5) \times 10^{12}/\text{L}$; Hemoglobina $15,7 (12,5-18,2) \text{ g/dL}$; VCM – $106 (95-113) \text{ fL}$; HCM- $33,8 (30,3-36,4) \text{ pg}$; Reticulócitos- $3,3 (2,0-4,7) \%$. Walka et al. (1998) referiram ainda que o SCU comparado com o sangue periférico de adultos, tem um maior número de leucócitos, reticulócitos e eritroblastos, bem como macrocitose e anisocitose mais acentuada, principalmente devido à presença de maior número de eritrócitos imaturos. Em outro estudo, valores hematológicos (exceto o número de hemácias e a concentração de hemoglobina corpuscular média), no SCU humano apresentaram-se mais elevados do que aqueles obtidos no sangue periférico de adultos sadios quando avaliados por contadores

automáticos de células, esfregaços corados com Metanol May-Grunwald Giemsa (MMG), citometria de fluxo e culturas celulares semi-sólidas (RUBINSTEIN et al., 1995; CHAISIRIPOOMKERE et al., 1999).

Pranke et al. (2001) analisaram as moléculas de superfície de monócitos, linfócitos e células CD34⁺ do SCU humano através da citometria de fluxo de duas cores. A população de células mononucleares foi composta de 22,9±7,2% de monócitos e 77,05 ± 7,24% de linfócitos, entre os quais 46,59±15,62% eram linfócitos T, sendo linfócitos T auxiliares (CD3⁺CD4⁺) 43,94±16,94% e T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺) 13,45±7,46%. As células CD34⁺ foram em média 0,54±0,24% da fração mononuclear. Dentre as células que co-expressam CD34⁺, as células CD31 e HLA-DR foram as moléculas com maior frequência (79,7 e 65,7 %) seguidas CD62L e CD117⁺ (41,8 e 20,1%) respectivamente. Schultz, et al., (2000) relatam uma contagem absoluta de leucócitos, assim como de subpopulações linfocitárias menor no SCU quando comparado com o sangue periférico de neonatos, e na fase adulta declina, esta tendência é reflexo de mudanças relativas.

Na literatura médico-veterinária brasileira, há poucos relatos sobre células-tronco do SCU, exceção feita aos trabalhos pioneiros, conduzidos em SCU de cães (NAKAGE et al., 2005), eqüídeos (GODOY, 2003; 2007a; 2007b) e gatos, todos inerentes a uma linha de pesquisa do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp, Campus de Jaboticabal. Além disso, apesar da ampla utilização dos suínos como modelo de estudo para várias doenças hematológicas e não hematológicas, não existem dados bibliográficos referentes às características citológicas e bioquímico-séricas do SCU da referida espécie animal.

Nakage et al. (2005) reportaram que as células-tronco CD34⁺ do SCU de cães $0,88 \times 10^6/\text{mL}^{-1}$ correspondem a 33% das células mononucleares ($2,61 \times 10^6/\text{mL}^{-1}$).

Num experimento realizado por Terzik et al., (2002), ao quantificar as células CD45⁺ do sangue periférico de suínos de 12 semanas de idade, foi encontrada a média de 86,3% (variando entre 68% e 98,2%). Valores similares foram também reportados por Haversson et al. (1994).

Cápua et al. (2009) quantificaram linfócitos T CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ no SCU de neonatos caninos e compararam com sangue periférico de adultos. Constataram que a contagem total de linfócitos T foi baixa no SCU, quando comparada com aquele verificado no sangue periférico de cães adultos; e a proporção CD4:CD8 mostrou uma grande dominância das células T CD4⁺ sobre os linfócitos T CD8⁺ no SCU.

Outros estudos em cães (FALDYNA et al., 2001; HEGEN ESCH et al., 2004) demonstraram que a porcentagem de células T CD8⁺ aumenta gradualmente com a idade, enquanto a proporção CD4⁺: CD8⁺ decresce.

Godoy et al. (2007^a), comparando SCU e periférico de equinos neonatos e de equinos adultos, verificaram que a contagem de linfócitos TCD5 e TCD4 no SCU e da jugular do neonato foi inferior ao reportado em equinos adultos. No entanto a contagem de CD8⁺ foi semelhante àquela reportada em adultos. A proporção CD4 :CD8 obtida neste mesmo ensaio, tanto para o SCU, quanto para o sangue periférico, em eqüinos neonatos, revelou dominância das células T CD4⁺ sobre os linfócitos TCD8⁺.

Apesar da importância de que se revestem estes estudos, particularmente, no que concerne à importância do suíno como modelo animal para pesquisas biomédicas, e ao valor do SCU como fonte alternativa de células-tronco hematopoiéticas, não existem estudos publicados com relação às características do SCU de suínos, particularmente no que se refere às técnicas de coleta, aos aspectos qualitativos e quantitativos de sua celularidade, ao rendimento total de células-tronco hematopoéticas, dentre outros.

2.7 Objetivos

Buscando contribuir para o conhecimento das características fenotípicas do SCU de suíno, bem como das suas características eritroleucométricas,desenhou-se este estudo com os seguintes objetivos:

- i. Quantificar células CD117⁺, CD45⁺ e subpopulações linfocitárias no SCU;

- ii. Quantificar células CD117⁺, CD45⁺ e subpopulações linfocitárias no sangue periférico, imediatamente após o nascimento e 48 horas depois do nascimento, e comparar com os valores obtidos do SCU.
- iii. Determinar os parâmetros eritroleucométricos do SCU e periférico de suínos neonatos.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parcelas experimentais

Foi utilizado um total de 48 leitões e suas amostras biológicas foram distribuídas em três grupos experimentais diferentes de acordo com o local e tempo de coleta. Assim temos:

Grupo 1- SCU- sangue do cordão umbilical (SCU) de suíno.

Grupo 2- SPI- sangue periférico de suínos imediatamente após o nascimento.

Grupo 3- SP48-sangue periférico de suínos, 48 horas após o nascimento.

Os 48 leitões foram oriundos de porcas de linhagem *Topigs*, sadias, artificialmente inseminadas, nascidos de parto natural, dos quais foi colhido SCU imediatamente ao nascimento e sangue periférico do seio venoso retro-oftálmico imediatamente após o nascimento e 48 horas depois. Os animais foram oriundos da granja comercial “A ESTIVA”, localizada nos arredores de Jaboticabal,SP.

3.2 Instalações

Seguindo o esquema de trabalho da granja, numa primeira fase, as matrizes prenhes foram alojadas em baias coletivas, dotadas de barra de proteção para cada porca, respeitando-se um espaço vital mínimo de 1,5m²/matriz. Aos 110 dias de

gestação, as fêmeas foram transferidas para a maternidade e alojadas em baias individuais com área de 3,6 m² e igualmente dotadas de barra de proteção a uma altura de pelo menos 28 cm do piso (para diminuir a quantidade de esmagamentos), onde permaneceram junto às suas crias até ao final da lactação (Figura 2.)



Figura 2. Porca contida em baia individual aguardando início de serviço do parto. Jaboticabal, SP, 2011.

3.3 Coleta de material biológico

As amostras de sangue, depois de coletadas foram devidamente identificadas e colocadas em uma caixa térmica e conduzidas para o Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal para exames hematológicos e preparo para citometria de fluxo.

Sangue do cordão umbilical

Geralmente, a apresentação do leitão durante o parto é cefálica e o cordão umbilical permanece ligado à placenta até a ruptura e extravasamento do SCU. Assim, para evitar o extravasamento do SCU, os leitões foram contidos de modo a evitar a ruptura do cordão e, em seguida, sem clampeamento, com auxílio de uma agulha estéril acoplada a uma seringa de 3 mL, contendo ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K_2 – EDTA), foi efetuada punção e coleta do SCU na porção justa placentária do cordão umbilical, e o sangue recolhido num tubo sem anticoagulante (Figura 3).



Figura 3. Ilustração do procedimento adotado para a coleta de sangue do cordão umbilical de neonato na porção justaplacentária da veia umbilical. Jaboticabal, SP, 2011.

Sangue periférico

Imediatamente após o nascimento e 48 horas depois, foram coletados de cada leitão 2 mL de sangue periférico, por intermédio da punção do seio venoso retro-oftálmico. O sangue foi recolhido em tubos BD Vacutainer™ de 2 mL, contendo ácido etilenodiaminotetracético (k₂-EDTA) como anticoagulante, para exame hematológico e avaliação citofluorométrica.

Volume do SCU e peso dos leitões

Logo após o nascimento e coleta do SCU e periférico, foi determinado o volume de sangue colhido do cordão umbilical, de cada leitão, assim como seu peso individual. Em seguida, foram todos os leitões devidamente identificados.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Avaliação citofluorométrica

O preparo das amostras foi efetuado em um período máximo de 24 horas, após a coleta do sangue, e o procedimento foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. Foram utilizados oito tubos cônicos Falcon, onde foram colocados 100 µL de sangue total e, posteriormente, adicionados os volumes dos anticorpos monoclonais conjugados na seguinte ordem:

Tabela 1 Preparo das amostras de sangue para análise citométrica.

Tubo	Amostra	Volume do anticorpo	Molécula	Florescência	Anticorpo Monoclonal	Tipo Celular
1	100µL	—	—	—	—	—
2	100µL	2µL	IgG2b IgG2a	alexa fluor 488 PE	MCA691* MCA929*	Isótopo controle isótopo controle
3	2µL	2µL	CD4 CD8	FITC PE	MCA174* MCA1223*	linfócito T auxiliar linfócito T citotóxico
4	100µL	2µL	F(Ab')	alexa fluor 647	A21237 [▲]	anticorpo secundário
5	100µL	2µL	IgG1	alexa fluor 488	MCA2307*	Isótopo controle
6	100µL	2µL 0,5µL	CD5 F(Ab')	puro alexa fluor 647	MCA2307*	linfócitos T anticorpo secundário
7	100µL	2µL 0,5µL	CD45 F(Ab')	puro alexa fluor 647	MCA1222G* A21237 [▲]	Total de Leucócitos anticorpo secundário
8	200µL	2µL	CD117	alexa fluor 488	MCA2598A488*	anticorpo monoclonal

* Anticorpos monoclonais AbD Serotec;

▲ Anticorpo secundário Invitrogen

PE: Ficoeritrina ;

FITC: Isotiocinato de Fluorescencia

Após homogeneização, os tubos foram incubados protegidos da luz e em temperatura ambiente, por 20 minutos. Nos tubos 1,2,3,4,5, e 8, um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado em cada tubo e, novamente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por mais dez minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH entre 7,4 e 7,6 (PBS), por três vezes, adicionando-se 2mL de PBS por lavagem.

Nos tubos 6 e 7, após incubação por 20 minutos, foram adicionados 2mL de PBS, efetuada centrifugação a 1800 RPM por 3 a 5 minutos e, em seguida foi

desprezado o sobrenadante e adicionados 0,5 μ L de anticorpo secundário Goat anti-Mouse conjugado com fluorocromo Alexa flúor 647 e incubado protegido da luz por mais 20 minutos, à temperatura ambiente e em seguida, 1 mL de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado, novamente, à amostra homogeneizada e incubada por mais dez minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) uma vez, adicionando-se 2 mL de PBS. Em seguida, foram adicionados ao tubo seis 10 μ L dos anticorpos monoclonais CD4 e CD8, deixou-se incubar por mais 20 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz, e fez-se uma lavagem com PBS e desprezando-se o sobrenadante. Ato contínuo, depois das lavagens com PBS, foi adicionado a todos os tubos 2 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH entre 7,4 e 7,6, (PBS) a 1% de formol, para a preservação das células até a leitura. As amostras foram analisadas em até sete dias após o preparo, no citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA), localizado no Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto (FFRP), Universidade de São Paulo (USP).

Para identificar e quantificar as células CD117⁺, foram obtidos 100.000 eventos no sangue do cordão umbilical e no sangue periférico e, para tal, foi utilizado o programa FACSDiva (BD). No presente experimento foram obtidos somente os valores percentuais de células CD117⁺.

Para a identificação e quantificação das células CD45⁺, CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺, foram obtidos 10.000 eventos, no SCU e periférico, e para tal foi utilizado o programa FACSDiva (BD). Para os cálculos dos valores absolutos das células CD45⁺, CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ foi usada a seguinte fórmula:

O calculo dos valores absolutos de células CD45⁺ no SCU, SPI e SP48 foi realizado multiplicando-se os valores percentuais das referidas células pela contagem global de leucócitos e para subpopulações linfocitárias multiplicando-se os valores percentuais das referidas células pela contagem absoluta de linfócitos.

Tratando-se de um trabalho pioneiro com SCU de suíno, a quantificação do CD45 serviu essencialmente para a determinação dos valores de contagem de total de

leucócitos usando técnica mais atualizada. Por esta metodologia é possível separar linfócitos (P1), Monócitos (P2) e granulócitos (P3) vide Fig 4 (A) e delimitando o *gate* de linfócitos (P1), foi possível a separação dos linfócitos T CD8⁺ PE no quadrante Q1 e os linfócitos T CD4⁺ FITC-A no quadrante Q4 vide Fig.4 (B)

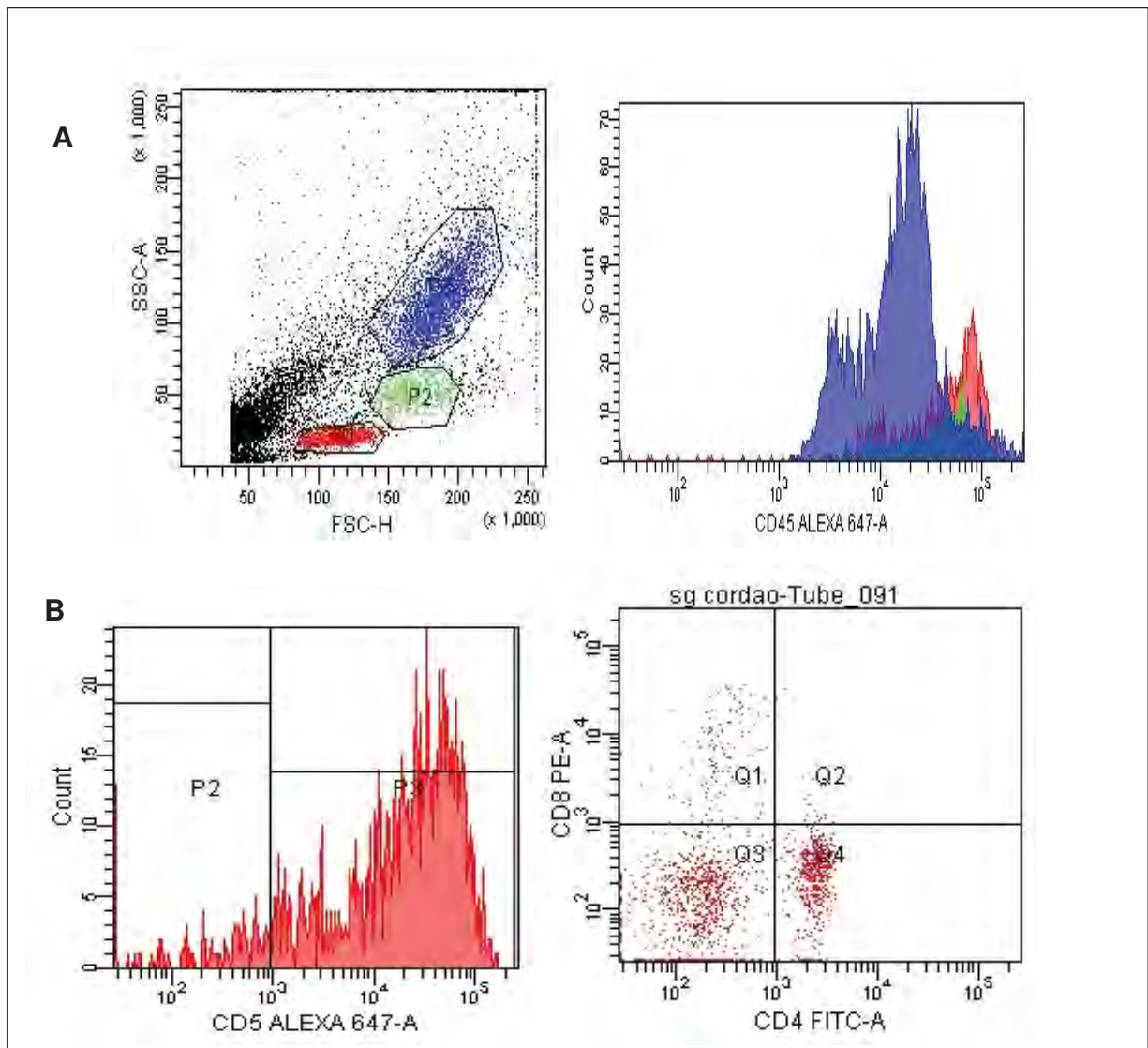


Figura 4. Representação gráfica de células por tamanho e complexidade (FSC/ SSC) indicando *gate* de linfócitos a vermelho (P1), monócitos a verde (P2) e granulócitos a azul (P3) e respectivo histograma (A). Histograma do pan de linfócitos e respectiva distribuição em quadrantes CD4⁺ FITC e CD8⁺ PE (B). Jaboticabal, SP, 2011.

3.4.2 Avaliação eritroleucométrica

A partir das amostras de sangue do cordão umbilical e sangue periférico, foram obtidos hematócrito, hemoglobina, contagens globais de hemácias, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), e a contagem total de leucócitos, com auxílio de um contador automático de células (ABC Vet - HORIBA ABX – São Paulo/Brasil). Em seguida, foram feitos esfregaços de sangue para a contagem diferencial de leucócitos, as lâminas coradas com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa e contagens foram efetuadas com auxílio de um microscópio, em objetiva de (100X) em óleo de imersão.

Reticulocitemetria

A contagem de reticulócitos, em esfregaços de sangue, foi feita incubando-se 100 μ L de sangue total com igual quantidade de azul brilhante de cresil em banho-maria, a 37°C, por 15 minutos. Após a incubação, confeccionaram-se esfregaços sanguíneos, que foram contracorados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa. Realizaram-se as contagens de reticulócitos com auxílio de um microscópio, objetiva de (100X) em óleo de imersão, foram contadas 500 células, sendo realizadas contagens de hemácias maduras e de reticulócitos, e a quantidade de reticulócitos foi expressa em porcentagem.

3.5. Análise estatística

Os resultados dos SCU, SPI e SP48 foram analisados por meio de estatísticas descritivas de média, erro padrão da média, valor mínimo e máximo e as comparações entre os grupos das variáveis do hemograma, contagem de reticulócitos, contagem das células CD117⁺, CD45⁺, CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ foram obtidas pelo teste t pareado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Coleta de sangue do cordão umbilical

A coleta de SCU foi realizada por venipunção da veia umbilical na porção justaplacentária do cordão umbilical de cada leitão. Revelou-se facilmente aplicável, principalmente nos casos de animais que apresentavam vasos mais calibrosos, e permitiu a coleta de um volume máximo de 10 mL e um mínimo de 2 mL e um valor médio de sangue de 5,125 mL. As diferenças no volume coletável são devidas à diferença de calibre do vaso umbilical entre a leitegada, rompimento do cordão, nascimento sucessivo de vários leitões impedindo melhor contenção e levando à entrelaçamento dos cordões seguido de rompimento.

4.2 Variáveis citofluorométricas

Quantificação de células CD117⁺

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens relativas de células CD117⁺, obtidos por citometria de fluxo foram: SCU (0,06%), SPI (0,1%) e SP48 (0,05%) e estão ilustrados na figura 5.

Nas comparações entre os três grupos estudados, os animais do SCU e SPI ; e SCU e SP48 não diferiram entre si com valores de ($p=0,14$) e ($p=0,74$) respectivamente. Já os dos grupos SPI e SP48 quando comparados entre si apresentaram diferença significativa a ($p<0,05$).

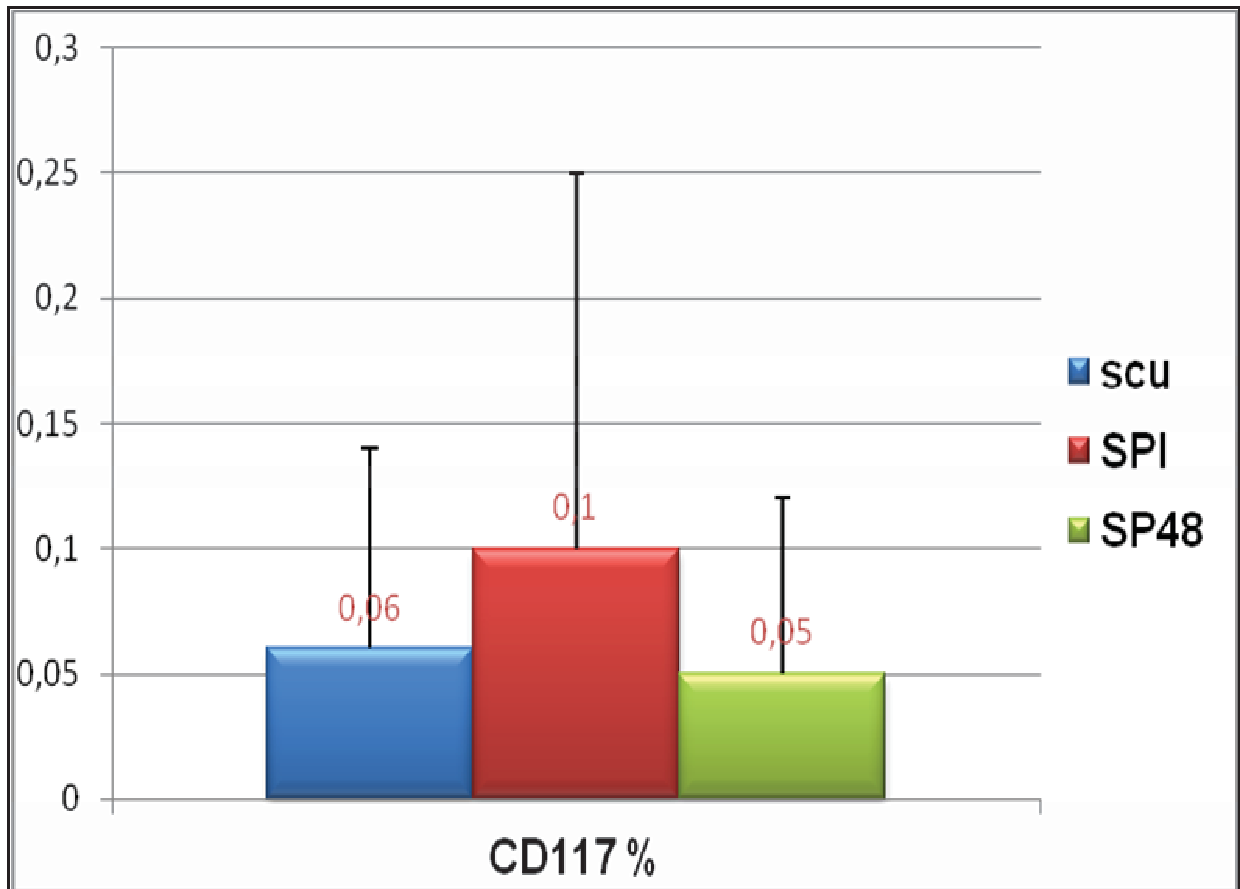


Figura 5. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem de células CD117⁺ do sangue do cordão umbilical (SCU), sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.

Quantificação de células CD45⁺

Os valores absolutos referentes á quantificação de células CD45⁺. Obtidos por citometria de fluxo, do sangue do cordão umbilical (SCU), sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos neonatos encontram-se ilustrados na figura 6

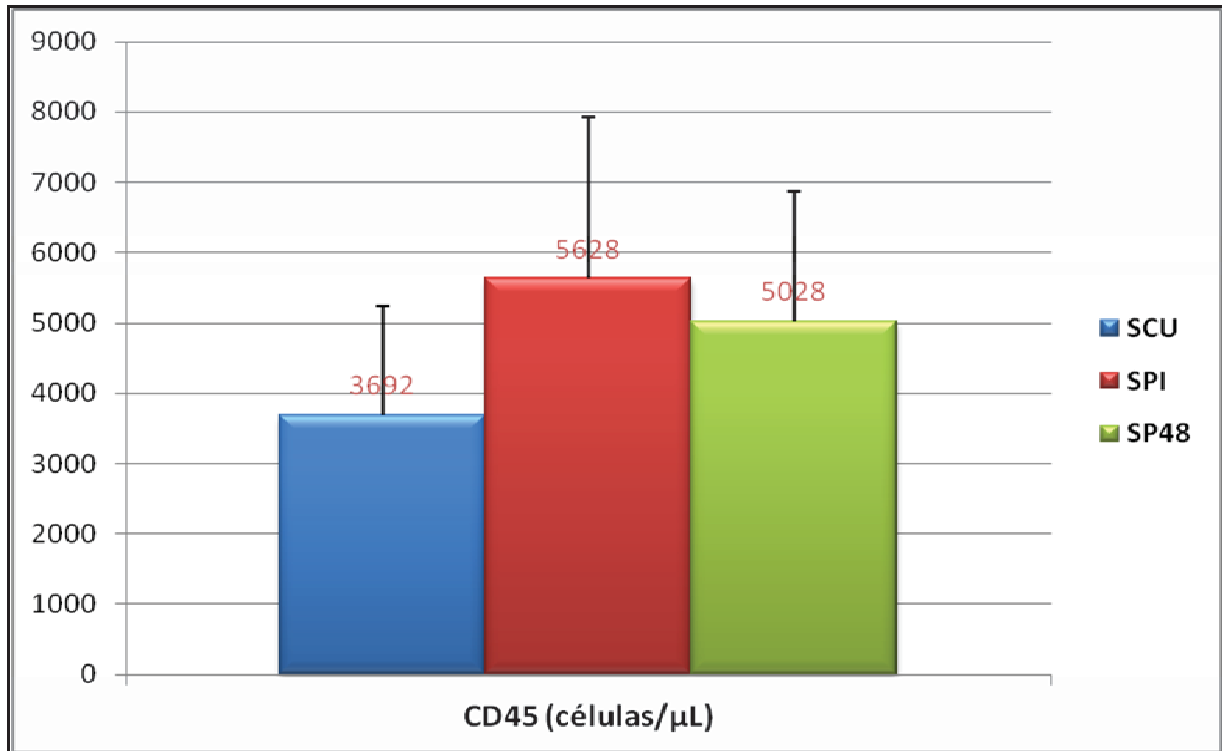


Figura 6. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem de células CD45⁺ do Sangue do cordão umbilical (SCU), Periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e Periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.

Relativamente a quantificação total de células CD45⁺ nos três grupos estudados, não foram verificadas diferenças significativas entre os animais dos grupos SPI e SP48 ($p=0,07$), entretanto, verificou-se diferença significativa entre os dos grupos SCU e SPI ; e entre SCU e SP48 a ($p<0,05$).

Quantificação de subpopulações linfocitárias

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens de células CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ do sangue do cordão umbilical (SCU), e naquele obtido do seio venoso retro-oftálmico imediatamente após o nascimento (SPI), e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) em suínos neonatos, estão apresentados na Tabelas 2 e ilustrados na figura 7.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão da contagem de células CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺, do obtido do Sangue do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.

Grupos	CD5+ células / μ L	CD4+ células / μ L	CD8+ células / μ L
SCU	812,7 \pm 434,7 A	455,3 \pm 198,9 A	154,8 \pm 76,3 A
SPI	1066,1 \pm 586,8 B	597,4 \pm 324,8 B A	211,7 \pm 121,2 B B
SP48	1094 \pm 493,4 B	494,7 \pm 307,1 A A	65,3 \pm 56,8 C B

Médias da mesma coluna, seguidas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si ($P < 0,05$) e estabelecem a comparação entre os grupos.

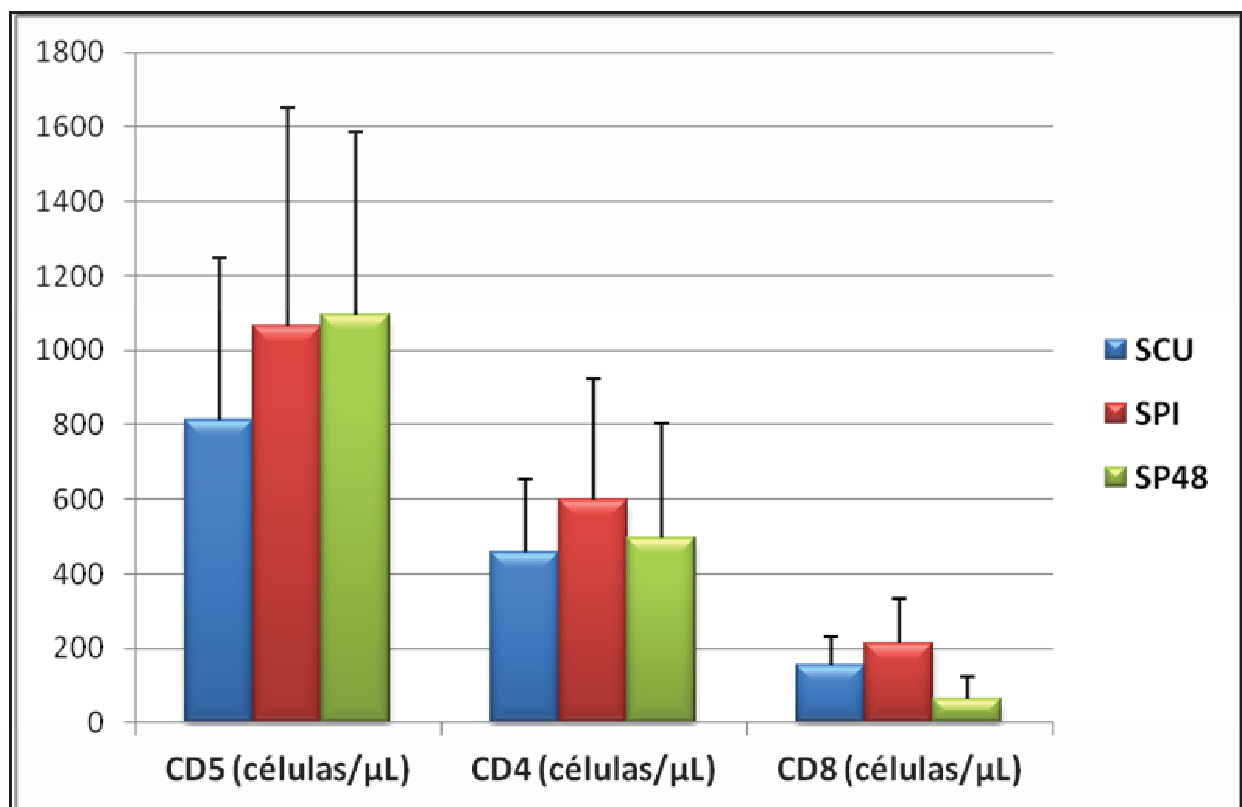


Figura 7. Representação gráfica dos valores médios obtidos da quantificação das células CD5⁺, CD4⁺, e CD8⁺, do Sangue do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011

Na quantificação de subpopulações linfocitárias não se observaram diferenças significativas no subconjunto CD5⁺ entre os animais dos grupos SPI e

SP48, $p=0,92$. Os grupos SCU vs SPI e SCU vs SP48 diferiram entre si a ($p<0,05$); relativamente a quantificação de células CD4⁺ não se observaram diferenças significativas entre os animais dos grupos SPI vs SP48, $p= 0,068$ e SCU vs SP48, $p=0,45$, entretanto foi observada diferença significativa entre SCU vs SPI a ($p<0,05$). Já a quantificação de células CD8⁺ foi observada diferença significativa entre os três grupos estudados SCU, SPI e SP48 a ($p< 0,05$).

Dos resultados obtidos da quantificação de células CD4⁺ e CD8⁺, obtivemos a razão CD4⁺/CD8⁺. Essa foi de 3,2 nos animais dos grupos SCU e SPI e quarenta e oito horas depois no grupo SP48 foi de 12,8.

Outro achado comum em suínos é a presença de células CD4⁺ CD8⁺ duplamente positivas e que foi igualmente quantificado neste experimento e foi possível constatar a presença de 1,3%, 1,15% e 1,8% destas células no SCU, SPI e SP48 respectivamente.

4.3 Variáveis eritroleucométricas

Eritrograma

Realizadas as avaliações do eritrograma entre os grupos estudados, SCU, SPI e SP48, a maioria mostrou diferença significativa a ($p<0,05$) entre si, excetuando-se os índices de células vermelhas nomeadamente VCM ($p= 1,0$), HCM ($p=0,34$) e, CHCM ($p= 0,75$) que não variaram entre os grupos, SCU e SPI. Os resultados podem ser vistos na tabela 3 e ilustrados na figura 8.

Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para contagem global de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue colhido a partir do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.

Grupos	Total de Hemácias (X10 ⁶ células/ μ L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pc)	CHCM (g/dL)
SCU	5,04 \pm 0,60 A	9,16 \pm 1,19 A	33,6 \pm 4,04 A	66,7 \pm 3,46 A	18,4 \pm 2,22 A	27,2 \pm 2,21 A
SPI	5,66 \pm 0,69 B	10,25 \pm 1,28 B	37,7 \pm 4,23 B	66,7 \pm 3,23 A	18,1 \pm 1,39 A	27,2 \pm 1,82 A
SP48	4,26 \pm 0,51 C	8,2 \pm 0,91 C	26,9 \pm 2,9 C	63,3 \pm 3,0 B	19,5 \pm 2,08 B	30,8 \pm 3,04 B
	5,0 - 8,0	10,0 - 16,0	32 - 50	50 - 68	16 - 22	30 - 34

Valores de referência suínos adultos Thorn (2000)

Médias da mesma coluna, seguidas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si ($p < 0,05$) e estabelecem a comparação entre os grupos.

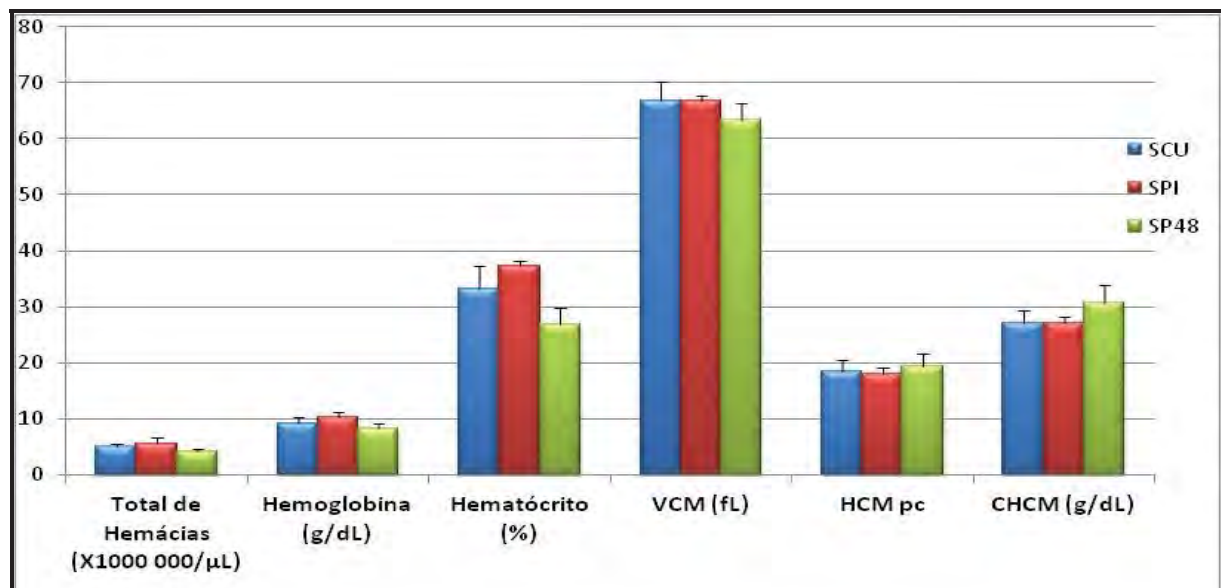


Figura 8. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem total de Hemácias, hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do sangue do cordão Umbilical (SCU), sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos n=48. Jaboticabal, SP, 2011.

Reticulocitometria

Os valores médios e desvios-padrão obtidos para reticulocitometria do sangue do cordão umbilical (SCU), do sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) foram de $10,8\% \pm 3,6$; $11,4\% \pm 4,9$ e $16,7\% \pm 12,08$ respectivamente tendo se verificado diferença significativa entre o SCU vs SP48; SPI vs SP48 a ($p > 0,05$). Os grupos SCU e SPI não diferiram entre si ($p = 0,47$). Os resultados estão ilustrados na figura 9.

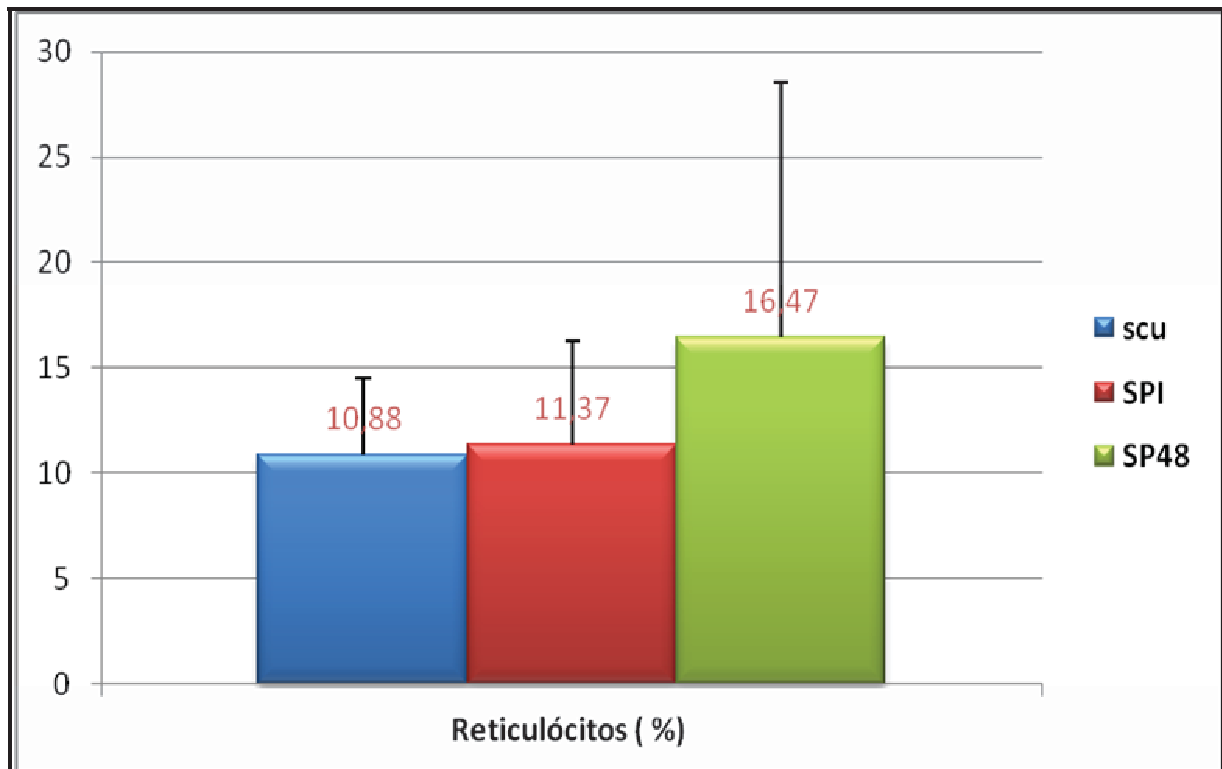


Figura 9. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem de reticulócitos do Sangue do cordão umbilical (SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e periférico quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) (n=48). Jaboticabal, SP, 2011.

Leucograma

Realizadas as avaliações das variáveis do Leucograma entre os grupos estudados, SCU, SPI e SP48 todos mostraram diferença significativa a ($p < 0,05$) quando comparados os animais do grupo SCU e SPI; e SCU e SP48, excetuando-se a contagem de monócitos ($p = 0,69$) que não variou entre os animais dos grupos, SCU e SPI. Já na comparação dos do SPI e SP48 foi observada diferença significativa a ($p < 0,05$) na contagem de monócitos e neutrófilos segmentados, enquanto o total de leucócitos ($p = 0,21$), linfócitos ($p = 0,056$) e neutrófilos bastonetes ($p = 0,37$) não diferiram. Os resultados podem ser vistos na tabela 4 e ilustrados na figura 10.

Tabela 4. Valores médios e desvios padrão obtidos da contagem total de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, do obtido do cordão umbilical(SCU), periférico imediatamente após o nascimento (SPI) e quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) de suínos neonatos ($n=48$). Jaboticabal, SP, 2011.

Grupos	Total de Leucócitos (X10 ³ células / μ L)	Neutrófilos Bastonetes (X10 ³ células / μ L)	Neutrófilos Segmentados (X10 ³ células / μ L)	Linfócitos (X10 ³ células / μ L)	Monócitos (X10 ³ células/ μ L)
SCU	4,87 \pm 1,57 A	0,045 \pm 0,049 A	3,07 \pm 1,13 A	1,53 \pm 0,74 A	0,15 \pm 0,11 A
SPI	6,98 \pm 2,5 B	0,098 \pm 0,14 B	4,75 \pm 2,31 B	1,91 \pm 0,84 B	0,16 \pm 0,12 A
SP48	6,61 \pm 2,00 B	0,13 \pm 0,12 B	3,82 \pm 1,66 C	2,26 \pm 0,81 B	0,33 \pm 0,26 B
	11 - 22	0 - 0,8	3,0 - 10,3	4,3 -13,6	0,22 - 2,2

Valores de referência suínos adultos Thorn (2000)

Médias da mesma coluna, seguidas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si ($p < 0,05$) e estabelecem a comparação entre os grupos.

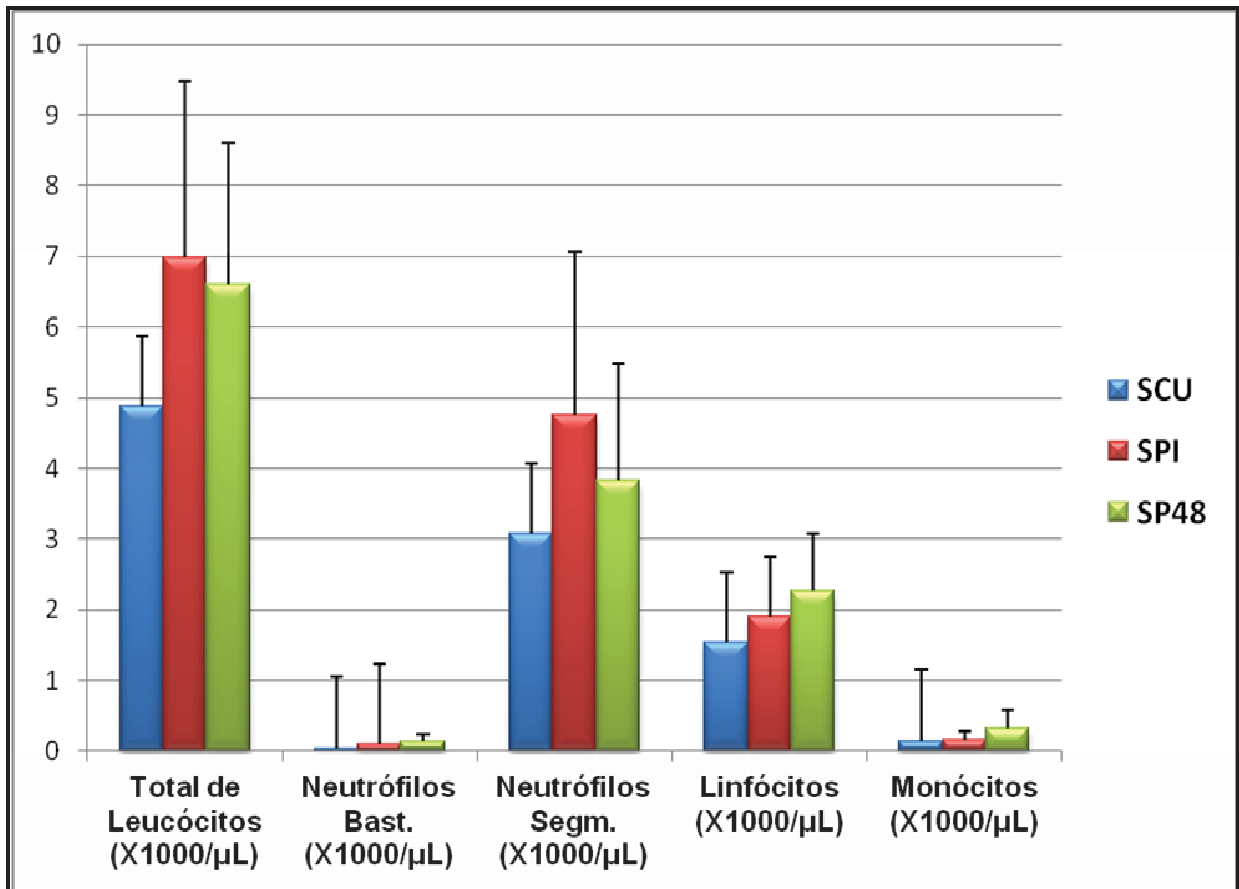


Figura 10. Representação gráfica dos valores médios obtidos da contagem total de Leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, Linfócitos e monócitos, do sangue obtido do cordão umbilical (SCU), sangue periférico obtido imediatamente após o nascimento (SPI) e sangue periférico obtido quarenta e oito horas após o nascimento (SP48) em suínos n=48. Jaboticabal, SP, 2011.

5. DISCUSSÃO

Até o presente não existe nenhum procedimento padronizado para a coleta de SCU em suínos. Assim, o procedimento usado nesse caso foi considerado mais adequado para as condições de coleta em granja, de modo a permitir menor contaminação.

Esse procedimento de coleta, punção da veia umbilical na porção justa placentária do cordão umbilical, com a placenta *in loco*, permitiu obter uma quantidade de sangue suficiente para a realização de todos os testes previstos. Esse mesmo procedimento foi adotado em humanos por Bertolini et al. (1995), permitindo a redução da contaminação bacteriana de 12,5% para 3,35%. Além disso, esse método de coleta permite obter maior quantidade de SCU, segundo o relatado igualmente em humanos por Cairo et al. (1997) e Surbek et al. (2000).

Na avaliação do eritrograma, observa-se que os valores médios obtidos no SCU para as variáveis do eritrograma estudadas nomeadamente, total de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito foram inferiores aos obtidos no SPI enquanto que os índices de células vermelhas, VCM e CHCM foram semelhantes aos obtidos no SPI e o HCM discretamente superior no SCU comparativamente ao SPI.

Quando comparados aos valores de referência para suínos adultos, a maioria das variáveis eritrocitárias, do SCU se encontra dentro dos limites considerados normais, à exceção da hemoglobina e CHCM que se encontram ligeiramente abaixo (vide Tabela n. 1). Estas constatações não se aplicam em humanos visto que Rubinstein et al. (1995) e Chaisiripoomkere et al. (1999) reportaram valores de eritrograma do SCU superiores aos obtidos no sangue periférico de adultos, com exceção do número de hemácias e CHCM.

Na análise dos dados do eritrograma, comparando-se os grupos estudados, os valores referentes ao total de hemácias, hematócrito e concentração da hemoglobina do SCU foram inferiores aos do SPI e, 48 horas após o nascimento, foi observada uma redução nas mesmas variáveis, que se deve à expansão do volume do plasma que ocorre dias após o nascimento, conforme reportado por Miller et al. (1961). Ainda dentro do grupo SP48, a redução do total de hemácias, hemoglobina, hematócrito e VCM, para valores abaixo da faixa de normalidade, (vide tabela 1) pode estar relacionada ao estado pré-anêmico observado nas primeiras 48 horas de vida dos leitões (LIPINSKI et al, 2010).

A análise dos dados de reticulócitos no SCU permitiu constatar que a quantidade de reticulócitos é semelhante à observada no sangue periférico, imediatamente após o

nascimento e quarenta e oito horas após o nascimento, porém no grupo (SP48) observa-se um aumento. Resultados contrários foram reportados em humanos por Rubinstein et al., (1995) e Pranke et al., (2001), que referem uma quantidade maior de reticulócitos no SCU quando comparado ao periférico de adultos.

A contagem de reticulócitos, neste experimento, mostra-se igualmente superior à reportada por Jain (1993) em suínos em aleitamento (3-8%). Este aumento de reticulócitos, observado 48 horas após o nascimento se deve essencialmente ao estresse de nascimento, adaptação do pulmão a novas condições fisiológicas, nova hidratação associado à imaturidade do sistema fisiológico do neonato que experimenta hipóxia resultando em um aumento de reticulócitos na circulação.

Na concepção deste trabalho, foi também avaliado o quadro leucocitário nos três grupos estudados. Analisando-se os resultados obtidos do SCU, nomeadamente a contagem global de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, estes foram inferiores aos observados no sangue periférico imediatamente após o nascimento SPI e 48 horas após o nascimento SP48. Esses valores são igualmente inferiores aos valores de referência para suínos adultos, citados por Thorn (2000) (Tabela 2.) e para animais em crescimento ($15,4 \times 10^9/\mu\text{L}$ a $39,0 \times 10^9/\mu\text{L}$) citados por Klem et al. (2010), excetuando neutrófilos bastonetes que se encontram dentro da faixa de normalidade e neutrófilos segmentados que se encontram no limite inferior. Achado divergente foi relatado em seres humanos, por Walka et al. (1998) e Pranke et al. (2001), cujo número de glóbulos brancos no SCU foi superior ao do sangue periférico de adultos.

Na análise dos dados de leucograma é possível observar que as contagens das células leucocitárias neutrofílicas, nos três grupos estudados representam 60 a 70% do total de leucócitos, conforme reportado por SANTANA (1982); EGELI et al., (1998) e THORN, (2000). De outra parte, a análise do número de linfócitos permitiu constatar, por um lado, que os valores de linfócitos são inferiores aos reportados em adultos (Tabela 2) e, por outro lado, são observados aumentos significativos e gradativos dos linfócitos do SCU até SP48, fato que concorda com dados Sipos et al., (2011); Sinkora e Butler,

(2009) que reportam maior número particularmente destas células como parte do sistema imune adaptativo, principalmente durante a fase de crescimento.

O número de eosinófilos e basófilos neste experimento foi excluído, pois apresentava valores quase insignificantes.

Relativamente à quantificação de células CD117+, os resultados indicam um valor mínimo de zero nos três grupos estudados e valores máximos de 0,3, 1,0 e 0,3 para SCU, SPI e SP48, respectivamente. Esses resultados permitiram presumir que as células presentes no SCU, provavelmente são células hematopoiéticas mais primitivas, tendo em conta o fato de que células do SCU são ricas em progenitores hematopoiéticos primitivos, e que se encontram no estágio dormente do ciclo celular, de acordo com Gasper (2000); LAYER et al., (1995) que referem que células progenitoras hematopoiéticas mais primitivas se encontram no estágio G0 do ciclo celular e são CD34⁺/c-kit^{low}, suportado pelos resultados de Sakabe et al, (1998) e Xiao et al., (1999), que sugerem que precursores mais primitivos não expressam c-Kit ou expressam c-kit em baixo nível.

Entretanto, melhor quantificação e análise de progenitores hematopoiéticos primitivos com este marcador (CD117) seriam feitas em presença de um marcador de células-tronco específico para a espécie suína, pois dados de literatura de Laver et al., (1995); Sakabe et al, (1998) e Xiao et al., (1999) indicam identificação e análise mediante o grau de coexpressão de células CD117⁺ no subconjunto CD34⁺. Por isso este trabalho prendeu-se apenas à determinação por citometria de fluxo do valor relativo de células CD117⁺ presentes na amostra.

Analisando-se os dados referentes à quantificação de células CD45⁺ neste trabalho, obteve-se quantidade menor de células CD45⁺ no SCU, quando comparado com os animais do grupo SPI e, quarenta e oito horas depois, no grupo SP48, observou-se um ligeiro decréscimo. Esses resultados estão em consonância com a quantificação de leucócitos pelo contador automático de células (ABC Vet - HORIBA ABX – São Paulo/Brasil). Sendo o CD45 um marcador para o pan-leucocitário e este um estudo pioneiro com SCU de suínos assim como com neonatos, foi interessante confrontar os resultados das duas metodologias, citometria de fluxo e a contador

automático. E, nos dois casos, a quantificação observou o mesmo perfil, menor quantidade de células no SCU, seguido de um aumento no SPI e depois um decréscimo nos grupo SP48. Entretanto a quantidade de células CD45⁺, nos três grupos estudados neste experimento, foi menor que a reportada por Terzic et al., (2002) e Haverson et al (1994) em animais na fase pré engorda.

No que concerne à quantificação de linfócitos T, os resultados obtidos neste experimento indicam quantidades de células T CD5⁺ e subpopulações linfocitárias, CD4⁺ e CD8⁺, no SCU, menores e significativamente diferentes das obtidas do sangue periférico imediatamente após o nascimento (SPI). Resultados similares foram obtidos por Schultz et al., (2000) em imuno-hematologia de seres humanos; Godoy et al., (2007) e Cápua et al., (2009) em caninos. Esse resultado sugere um componente imunológico imaturo, e é explicado pela expressão tardia de moléculas de superfície após o nascimento (SCHULTZ et al., 2000). Porém valores relativos de células CD5⁺ (56,2%) no SCU, e SPI (56,5%) e SP48 (48,3%) foram similares àquelas relatadas em estudos prévios conduzidos por TIZZARD (2002) e LI et al.(2001) (47-57%), porém, em suínos adultos.

Relativamente às porcentagens médias, obtidas por citometria de fluxo no SCU, CD4⁺ (31%) e CD8⁺ (10,6%); e no SPI, CD4⁺ (30,8%) e CD8⁺ (11,1%); e no SP48, CD4⁺ (21,77%) e CD8⁺ (3,2%). Tais porcentagens médias revelam-se relativamente mais baixas, quando comparadas àquelas obtidas por Pescovitz et al. (1998), (41% e 16-24%) e Whittall & Parkhouse (1997), (36% e 29%), respectivamente, mais uma vez, no sangue periférico de suínos adultos. Estes resultados são um forte indicativo da tolerância imunológica dos linfócitos T do SCU e do sangue periférico de suínos neonatos comparativamente aos animais adultos.

A razão CD4⁺CD8⁺, no presente estudo, foi 3,2 tanto para o SCU como para o SPI; e 12,8 no grupo SP48, demonstrando uma dominância de células CD4⁺.

Neste estudo, obteve-se um subconjunto de linfócitos T CD4⁺CD8⁺ duplamente positivos, apresentando valores de 1,3%, 1,1%, 1,85% no SCU, SPI e SP48, respectivamente. Esses resultados corroboram com os obtidos por Zuckermann et al., (1996) que reportaram linfócitos CD4⁺ CD8⁺ duplamente positivos (<2%) em suínos

com uma semana de idade. Aqui, vale ressaltar que um número considerável deste subconjunto de células é detectado no baço e sangue periférico de acordo com Joling et al., (1993) e Pescovitz et al., (1985). Em outras espécies presume-se que estas células morram no timo (ABBAS & LICHTMAN, 1998). Contudo, suínos são uma exceção, pois quantidades de CD4⁺ CD8⁺ duplamente positivas são detectadas no sangue e baço e também em linfonodos, embora sua função seja desconhecida. TIZARD (2002) e ZUCKERMAN & HUSMANN (1996) sugerem que essa população de linfócitos T, duplamente positiva, pertence às células T efectoras de memória.

6. CONCLUSÕES

O método aplicado para a coleta do sangue do cordão umbilical de suínos permitiu obter uma quantidade suficiente de sangue para a realização de todos os testes previstos.

Os valores do eritrograma nomeadamente total de hemácias, hemoglobina e hematócrito do SCU apresentaram-se inferiores àqueles de suínos imediatamente após o nascimento (SPI) enquanto os índices VCM e CHCM foram similares aos obtidos no SPI e o CHCM discretamente superior. E tanto o SCU quanto a SPI se encontram dentro da faixa de normalidade para suínos adultos exceto hemoglobina e CHCM que se encontram abaixo. Quarenta e oito horas após o nascimento os valores do eritrograma foram inferiores ao SCU assim como ao SPI, exceto o HCM e o CHCM que foram superiores e se encontram abaixo da faixa de normalidade para suínos adultos excetuando o VCM, HCM e CHCM que se encontram dentro.

Relativamente á contagem de reticulócitos essa foi semelhante entre o SCU e SPI e aumenta quarenta e oito horas após o nascimento.

Os valores do leucograma do SCU apresentam-se menores àqueles do SPI e tanto o SCU, quanto SPI assim como o SP48, apresentam-se inferiores aos reportados em suínos adultos, à exceção dos neutrófilos bastonetes e segmentos que se encontram dentro da faixa de normalidade.

Relativamente á quantificação de células CD 117⁺ a marcação foi muito baixa, e recomendamos que a sua marcação seja combinada com o marcador da células tronco verdadeira.

Na quantificação de linfócitos T, o SCU apresenta uma quantidade menor de comparado ao sangue periférico de adultos sugerindo maior tolerância imunológica; e quanto à razão CD4:CD8 foi verificado maior dominância de células CD4⁺.

Nos três grupos estudados foram observados linfócitos T duplamente positivos.

7. REFERÊNCIAS ¹

ABBAS A.; LICHTMAN A.H.; POBER J.S. **Imunologia celular e molecular**, 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter,1998. p. 146-175, 254-275.

ALLEN, L. H. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: on overview. **American Journal of Clinical Nutrition**, Rockville, v. 8, n. 5, p. 1206-1212, 2005.

ALKINDI, S.; DENNISON, D. Umbilical cord blood banking and transplantation: a short review. **Sultan Quaboos University Medical Journal**, v.11, n.4, p.455-461, 2011.

ANDERSON, D.M.; LYMAN, S.D.; BAIRD, A.; WIGNALL, J.M.; EISENMAN, J.; RAUCH, C.; MARCH, C.J.; BOSWELL, H.S.; GIMPEL, S.D.; COSMAN, D. et al., Molecular cloning of mast cell growth factor, a hemopoetin that is active in both membrane bound and soluble forms. **Cell**, Cambridge, v. 63, n.1, p. 235-242, 1990.

¹ ABNT – NR6023

ANJOS, A.R.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matrix extracelular e leucemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, Santos, v.22, n.3, p.404-412, 2000.

BAY, J.O.; PEFFAULT DE LATOUR, R.;TOURNILHAC, O.; CHOUFI B.; CHASSAGNE, J. Hematopoietic growth factors an autologous or allogeneic stem cell transplantation. **Bulletin du Cancer**, Paris, v.93, n.5, p.473-482, 2006.

BENDER, A.L.; Von MUHLEN, C.A. Testes laboratoriais aplicados à imunologia médica In: VOLTARELLI, J.C.; DONADI, E.A.; CARVALHO, I.F.; ARRUDA, L.K.; LOUZADA Jr, P.; SARTI, W. **Imunologia na clinica médica**. São Paulo: Atheneu.2009. cap.5, p. 77-98.

BERENSSON, R.J.; ANDREWS, R. G.; BENSINGER, W.; KALAMAZ, D.; KNITTER, G.; BUCKNER, D.;BERNSTEIN, I.D. Antigen CD34+ Marrow Cells Engraft Lethally Irradiated Baboons. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.81, n.3, p. 951-955, 1988.

BERTOLINI F.; LAZZARI L.; LAURI E., CORSINI C.; CASTELLI C.; GORINI F ; SIRCHIA G. comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood. **Journal of Hematotherapy**, New York, v. 4, n.1, p. 29-36, 1995.

BINNS, R.M.; LICENCE,S.T.; WHYTE,A.; WILBY,M.; ROTHKOTTER, H.J.; BACON, M. Genetically determined CD45 variant of value in leukocyte tracing in vivo in pig. **Immunology**,Cambridge, v.86, p. 25-33, 1985.

BROXMEYER, H.E.; DOUGLAS, D.W.; HANGOG, G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, Whashington, v.86, n.10, p. 3828-3832, 1989.

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

CÁPUA, M.L.B., SANTANA, A.E., NAKAGE, A.P.M. GODOY, A.V., KATAOKA, A. *Subpopulações de linfócitos T no sangue de cordão umbilical de cães* **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.4, p.791-796, 2009.

CAIRO, M.S.; WAGNER, E. J. Placental and/or Umbilical Cord: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. **Blood**, Philadelphia, v.90, n.12, p. 4665-4678, 1997

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

COBBOLD, S.; METCALF, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Cambridge, v.43, n.3, p.137-154, 1994.

COOPER, D. K.; GOLLLACKNER, B.; SACHS, H. H. Will the pig solve the transplantation backlog? **Annual Review Medicine**, Palo alto, v. 53, p. 133-147, 2002.

COOKSON, S.; REEN, D. IL-15 drives neonatal T cells to acquire CD56 and become activated effector cells. **Blood**, Washington, v.102, n.6, p.2195-2197, 2003

CRAIG, W.; KAY, R.; CULTER, R.L.; LANSDORP, P.M. Expression of Thy-1 on human hemopoietic progenitor cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.177,n.5, p. 1331-1342, 1993

D'ARENA, G.; MUSTO,P.; CASCAVILLA,N.; Di GIORGIO, G.; ZENDOLI, F.; CAROTENUTO,M.; Umbilical Cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. **Haematologica**, v.81, n.6, p.404-409.

DEAN, G.A. Cytokine regulation of hematopoiesis. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Section 2, p. 86-89.

DUBREUIL, P.; FARMER, C.; COUTURE, Y.; PETICLERC, D. Hematological and Biochemical changes following an acute stress in control and somatostatin-immunized pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 73, n.2, p. 241-252. 1993.

EAPEN, M.; RUBINSTEIN,P.; ZHANG,M.J.; STEVENS, C.; KURTZBERG,J.; SCARADAVOU, A.; LOBERIZA, F.R.; CHAMPLIN, R.E.; KLEIN, J.P.; HOROWITZ, M.M.; WAGNER, J.E. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukemia: A comparison study. **Lancet.**, London, v .369, n.9577, p. 1947–1954, 2007.

EGELI,A.K.; FRAMSTAD,T.; MORBERG,H. Clinical biochemistry, hematology and body weight in piglets. **Acta Veterinária Scandinavica**, Copenhagen, v.39, n.3, p.381-393, 1998.

ELBERS, A.R.W.; COUNOTTE G.H.M.; TIELEN M.J.M. Haematological and Clinicochemical blood profiles in slaughter pigs . **Veterinary Quarterly**, Boxtel, v.14, n.2, p. 57-62, 1992.

FALDYNA, M.; SINKORA, J.; KNOTIGOVA, P. , REHAKOVA, Z., MORAVKOVA, A., TOMAN, M. Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs.

Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v.95, n. 3-4, p.165-176, 2001.

GASPER, P.W. Hematopoiesis. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Section 2, p. 63 - 78.

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

GODOY, R.F. Estudo hematológico e proteínograma do sangue do funículo umbilical de eqüídeos neonatos. 64f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal2003.

GODOY, R. F. Imunofenotipagem de Subpopulações de Linfócitos –T no Sangue do Cordão Umbilical de Eqüinos. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GODOY, R. F. et al . Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue do cordão umbilical de eqüinos. **Cienc. Rural**, v. 37, n. 3, 2007a.

GODOY, R.F.; SANTANA, A.E.; CAMPOS FILHO, E. and OLIVEIRA, J.V.. Estudo eritroleucométrico e proteinograma sérico do sangue do cordão umbilical e jugular de eqüinos ao nascimento e de suas respectivas mães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**v.59, n.6, p. 1376-1381, 2007b.

GREWAL, S.; BARKER, J N; STELLA, M.; DAVIS, S M,; WAGNER ,J. E. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? **Blood: The Journal of haematology**, New York, vol. 101, n.11, p. 4233-4234, 2003.

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

GUNGI, Y.; NAKAMURA, M.; OSAWA, H.; NAGAYOSHI, K.; NAKAUCHI, H.; MIURA, Y.; YANAGISAWA, M.; SUDA, T. Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KIT^{low} cells than in KIT^{high} cells. **Blood: The Journal of Haematology**, New York, v.82,n.11,p. 3283, 1993.

HAYAKAWA, K. ; HARDY, R. R. Normal, autoimmune and malignant CD5+ B cells: the Ly-1 B lineage. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 6 p.197–218,1988.

HAVERSSON,K.;BAILLEY,M.; HIGGINS,V.R.; BLAND,P.W.; STOKES,C.R. Characterization of Monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues . **Journal of immunological Methods**, Amsterdam v. 170,n.2, p.233-245, 1994.

HEGEN ESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A. et al. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Amsterdam, v.94, n.1-2, p.77-85, 2004.

IKUTA K. ; WEISSMAN I. L. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. **Proceedings of the National Academy of Science**, Whashington, v.89, p. 1502-1506,1992

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.1221p.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.19-53.

JIN, C.H.; TAKADA,H.; NOMURA,A.; TAKAHATA,Y.; NAKAYAMA,M.; KAJIWARA, M.NAKANO,H.; HARA,T. Immunophenotypic and functional characterization of CD33⁺CD34⁺ cells in human cord blood of preterm neonates. **Experimental hematology**, Amsterdam, v.28, n.10, p.1174-1180,2000.

JOLING, P.; BIANCHI,A.T.J.; KAPPE, A.L.; ZWART,R.J. Distribution of Lymphocyte Subpopulation in Thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.40, p.105-117,1994.

JONJIK, S.; KOSZINOWSKI, U.H. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes: I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.133, n.2, p. 647–652, 1984.

KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D.F.; HANSON,C.A.; HARTUBISE, P.E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society, 1994. p.197.

KLEM T.B.; BLEKEN E.; MORBERG H.; THORESEN S.I.; FRAMSTAD T. Hematologic and biochemical reference intervals for Norwegian crossbreed grower pigs. **Veterinary Clinical Pathology**, Oslo, v.39, n.2, p. 221-226, 2010.

LAUGHLIN, M.J.; EAPEN, M.; RUBINSTEIN, P.; WAGNER, J.E.; ZHANG, M.J.; CHAMPLIN, R.E.; STEVENS, C.; BARKER, J.N.; GALE, R.P.; LAZARUS, H.M.;

MARKS, D.I.; VAN ROOD, J.J.; SCARADAVOU, A.; HOROWITZ, M.M. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukaemia. **New England Journal of Medicine**, Whatham, v. 351, n.22, p.2265–2275, 2004.

LAVER, J.H.; ABOUD, M.R.; KAWASHIMA, I.; LEARY, A.G.; ASHMAN, L.K.; OGAWA, M. Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.23,n.14, p.1515-1519, 1995

LE GUERN, A.C.; GIOVINO, M.A.; ABE, M.; THEODORE, P.R.; QI, J.; DOWN, J.D.; SACHS, D.H.; SYKES, M.; YANG, Y.-G. Stem cell activity of porcine c-kit+ hematopoietic cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.31, n. 9, p. 833-840, 2003.

LI, H.; CHEN Y. Phenotypic and Functional Analysis of Porcine T lymphocytes. **Tsinghua Science and Technology**. V.6.n.3.p.273-276.2001

LIANG, L.; BICKENBACH, J. R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. **Stem Cells**, Dayton, .v.20, n.1, p.21-31, 2002.

LIPINSKI, P.; STARZYNSKI, R.R.; CANONE-HERGAUX, F.; TUDEK, B.; OLINSKI, R.; KOWALCZYK, P.; DZIAMAN, T.; THIBAudeau, O.; GRALAK, M.A.; SMUDA, E.; WOLINSKI, J.; USINSKA, A.; ZABIELSKI, R. Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.177, n.3, p. 1233-1243, 2010.

LOCATELI, F.; GIORGIANI, G.; BERGAMI, E. Cord blood: a new source of hematopoietic stem cells. **Haematologica Reports**, Pavia, v.2, n. 10, p. 122-125, 2006

LOWELL, C.L. Métodos Laboratoriais Clínicos para detenção da Imunidade Celular. In: PARSLOW T.G.; STITES G.P.; TERR A.I.; IMBODEN J.B. **Imunologia médica**. 10^o.ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2001.p. 202-215.

LI L.; SHEN R.; BROXMEYER H.E., Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Roton, v. 22, n.2, p. 61-78, 1996.

LUNNEY, J.K.; WALKER, K.; GOLDMAN, T. AASTED, B.; BIANCHI,A.; BINNS, R.; LICENCE,S.; BISCHOF,R.; BRANDON,M.; BLECHA,F.et al. Overview of the first international workshop to define swine leukocyte cluster of differentiation (CD) antigens. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.43, n.1-3, p.193-144, 1994.

LUNN, D.P. et al. Summary report of the Second Equine Leukocyte Antigen Workshop. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.54, n.1-4, p.159-161, 1996.

MANCINELLI,F.;TAMBURINI,A.;SPAGNOLI,A.; MALERBA,C.; SUPPO,G.;LASORELLA, R.; DE FABRITJIS, P.; CALUGI, A. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. **Transplantation Proceedings**, Orlando, V.38, N4, p.1174-1176, 2006.

MARMONT, A.M., New frontiers for allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.11, n.1, p.3-10, 1993.

McGEADY T.A.; QUINN P.J.; FitzPATRICK; RYAN M.T. **Veterinary embriology** . Ames: . Blackwell, 2006.Cap. 9, p. 66-77.

McNIEC, I., KUBEGOV, D., KERZIC, P., SHPALL, E.J., GROSS, S. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two step expansion culture. **Experimental hematology**. Amsterdam, v.28, n.10, p.1181-1186, 2000.

MILLER E.R. et al., Swine hematology from birth to maturity II. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.20, p.890-897.1961

MIYAZAWA, K.; TOYAMA, K.; GOTOH, A.; HENDRIE, P.C.; MANTEL, C.; BROXMEYER, H.E. Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07 e cells. **Blood: The Journal of Haematology**, Philadelphia, v.83, n.1, p. 137-145, 1994

NAESSENS, J. et al. Nomenclature and characterization of leukocyte differentiation antigens in ruminants. **Immunology Today**. Amsterdam, v.18, n.8, p.365-368,1997.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E; CÁPUA, M.L.B.; COELHO, P.S. metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35,n.4,p.966-973,2005.

NAKAGE, A.M.; SANTANA,A.E. Celulas tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1,p.325-329, 2006.

NEU, S.; GEISELHART, A.; KUCI, S.; BAUR, F.; NIETHAMMER, D.; HANDGRETINGER, R. Isolation and phenotypic characterization of CD117-positive cells. **Leukemia Research**, kidlington, v.20, n.11-12, p.963-971,1996.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THOMSON, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, Dayton, v.19, n. 3, p.193-204, 2001.

PAXTON, H.; KIDD, P.; LANDAY, A.; GIORGI, J.; FLOMENBERG, N. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 52, n. 1, p. 68-84, 1989.

PEAKMAN, M., VERGANI, D., TOROS, E.F. **Imunologia básica e clínica**, Rio de Janeiro: Guanabara, 1999. p. 1-30.

PÉREZ C.; MORENO S.; SUMMERFIELD A.; DOMENECH N.; ALVAREZ B.; CORREA C.; ALONSO F.; EZQUERRA A.; DOMINGUEZ J.; REVILLA C. Characterisation of porcine bone marrow progenitor cells identified by the anti-c-kit (CD117) monoclonal antibody 2B8/BM. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 321, p. 70-79, 2007.

PESCOVITZ, M.D.; LUNNEY J.K.; SACHS D.H. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.133, n.1, p.368-375, 1984.

PESCOVITZ, M.D.; LUNNEY, J.K.; SACHS, D.H. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.134; n.1, p.37-44, 1985.

PESCOVITZ, M.D., BOOK, B.K., AASTED, B., DOMINGUEZ, J., EZQUERRA, A., TREBICHAVSKY, I., ARN, S., SACHS, D.H., LUNNEY, J. K., BOYD, P.C., WALKER, J., LEE, R., DAVIS, W., BARBOSA, I.R., ZUCKERMANN, F. & SAALMULLER, A. Summary of workshop findings for antibodies reacting with porcine T cells and activation antigens: results from the Second International Swine CD Workshop. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.60, n.3-4, p.251-260, 1998.

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

PRANKE, P. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, v. 56 n. 3, p.33-38, 2004.

PRANKE P.; HENDRIKX J.; DEBNATH G.; ALESPEIT G.; RUBNSTEIN P.; NARDI N., VISSER J. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental / umbilical Cord blood after culture. **Brasilian Journal of medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v. 38, n.12, p.1775-1789,2005.

QUESENBERRY, P.J.; COLVIN, G.A. **Hematopoietic Stem cells, progenitor cells, and cytokines**. In: Williams. BEUTLER, E.; COLLER, B.S.; LICHTMAN, M.A.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. Hematology 6th ed.New Yirk, McGRAW-HILL, P. 2001.p. 153-174.

ROCHA, V. et al. Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA identical sibling transplants. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.29, n.11, p.1347-1352, 2001.

ROCHA V.; LABOPIN M.; SANZ G.; ARCESE W., SCHWERDTFEGER R.; BOSI A.; JACOBSEN N.; RUUTU T.; de LIMA M.; FINKE J.; FRASSONI F.; GLUCKMAN E. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukaemia. **New England Journal of Medicine**, Whatham, v.351, n22, p.2276–2285, 2004.

ROITT, I. et al. **Imunologia**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2003. 481p.

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

SAKABE,H.; OHMIZONO,Y.; TANIMUKAI,S.; KIMURA,T.; MORI,K.J.; ABE,T.; SONODA, Y. Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. **Stem Cells**, Dayton, v.15,n.1, p.73-83, 1997.

SAKABE H.; YAHATA N.; KIMURA T.; ZENG Z.Z.; MINAMIGUCHI H.; KANEKO H.; MORI K.J.; OHYASHIKI K.; OHYASHIKI J.H.; TOYAMA K.; ABE T.; SONODA Y. Human cord blood – derived primitive progenitors are enriched in CD34+ c-kit- cells: correlation between long-term culture- initiating cells and telomerase expression. **Leukemia**, London, v.12, n. 5, p.728-734, 1998

SAALMULLER A.; HIRT W.; REDDEHASE M.J. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4 - CD8 – and CD4+ CD8+ porcine T lymphocytes. **European Journal of Immunology**. v.19, p.2011, 1989.

SAALMULLER. A.; HIRT, W.; MAURER, S.; WEILAND, E. Discrimination between two subsets of porcine CD8⁺ cytolytic T lymphocytes by expression of CD5 antigen. **Immunology**, Oxford, v.81,n.4, p.578-583, 1994c.

SAALMULLER A.; AASTED B.; CANALS A.; DOMINGUEZ,J.; GOLDMAN, T.; LUNNEY, J.K.; MAURER, S.; PAULY, T.; PESCOVITZ, M.D.; POSPISIL,R.. Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5. **Veterinary Immunology and Immunopathol**, Amsterdam, v,43, n.1-3,p. 237-242,1994a.

SAALMULLER A.; BRYANT J. Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.43, n.1-3, p. 45-52,1994b

SAALMULLER, A. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. **Immunology Today**, Cambridge, v.17, n.8, p.352-354, 1996.

SAALMULLER, A.; LUNNEY, J.K. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD44: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.60, n. 3-4, p.375–392, 1998.

SCHNITZLEIN W.M.; ZUCKERMAN F.A. Determination of specificity of CD45 and CD45R monoclonal antibodies through the use of transfected hamster cells producing individual porcine Cd45 isoforms. **Veterinary immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.60, n.3-4, p. 391-403, 1998

SACHS D.H. The pig as a potential xenograft donor. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Amsterdam, v. 43, n.1-3, p. 185.1994.

SANTANA, A. E. **Benzenismo experimental: desenvolvimento da medula óssea ectópica**. Ribeirao Preto, 1988, 69f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1988.

SANTANA, A. E. **Efeitos hematotóxicos de dois diferentes níveis de dosagens de sulfato de vincristina (Oncovin) em cães (Canis familiaris, Linnaeus, 1758) sadios**. Jaboticabal, 2000, 106f. Tese (Livre-Docencia em Patologia Clínica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2000.

SCHMITZ, N.; LINCH, D.C.; DREGER, P.; GOLDSTONE, A.H.; BOOGAERTS, M.A.; FERRANT, A.; DEMUYNCK, H.M.; LINK ,H.; ZANDER, A.; BARGE A. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous

bone-marrow transplantation in lymphoma patients. **Lancet**, London, v.347, p.353–357, 1996.

SCHWINDT,G.T.;BARNABÉ,G.F.;MELO,L.E.A.M.Proliferar ou Diferenciar?Prespectivas de destino de células-tronco. **Journal Brasileiro de Neurocirurgia**. São Paulo, v.16, n.1, p. 13-19, 2005

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

SELL, S., **Stem cells handbook**. New Jersey: Humana Press 2004. p. 1-15; 143-146.
SIMMINS, P.J., AYLETT, G.W., NIUTTA, S., TO, L.B., JUTTNER, C.A., ASHMAN, L.K.: c-kit is expressed by primitive hematopoietic progenitor cells that give rise to colony forming cells in stroma-dependent or cytokine supplemented culture. **Experimental Hematology**. Amsterdam, v.22, n.2, p.157-165, 1993.

SIPOS, W.; WILLHEIM, M.; HOFBAUER, G.; PIETSCHMANN, P. Evaluation of the suitability of monoclonal antibodies applied for flow cytometric intracellular cytokine detection in porcine peripheral blood lymphocytes. **Journal of Veterinary Medicine A. Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlim, v. 52, n. 2, p.55–60, 2005.

SIPOS, W.; DUVIGNEAU, C.J.; HARTL, R.T.; SCHWENDENWEIN, I. Exploratory reference intervals on hematology and cellular immune system of multiparous Large White sows. **Veterinary Immunology and imunopathology** , Amsterdam, v.141, n. (3-4), p. 307-311.2011.

SINKORA, M.; BUTLER, J.E. The ontogeny of the porcine immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. V.33, n.3, p.273-283,. 2009.

SCHULTZ,C.;REISS,I.;BUCSKY,P.;GOPEL,W.;GEMBRUCH,U.;ZIESENITZ,S.;
GORTNER, L. Maturational changes of lymphocyte surface antigens in human blood:
Comparison between fetuses, neonates and adults. ***Biology of the Neonate***.Basel,
v.78, p.77-82, 2000

SUMMERFIELD, A.; HORN, M.P.; LOZANO, G.; CARRASCO, C.P.; ATZAE, K.;
McCullough, K. C-kit positive porcine bone marrow Progenitor cells identified and
enriched using recombinant stem cell factor. **J. Immunol. Methods**, v. 280,n. 1-2, p.
113-123, 2003.

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

SVOBODA, M.; DRABEK, J: Iron deficiency in suckling piglets: etiology, clinical aspects
and diagnosis. *Erenaria*, Kosice,v.49, n.1, 49:104–111,2005

TANAKA, Y.; SANO, S.; NIEVES, E.; De LIBERO, G.; ROSA, D.; MODLIN,
R.L.;BRENNER, M.B.; BLOOM, B.R.; MORITA, C.T. Nonpeptide ligands for human
gamma delta T cells, **Proceedings of the National Academy Science** ,USA,
Whashington, v.91, n.17, p. 8175–8179, 1994.

TERZIK, S.; SVER, L.;VALPOTIC,I.; LOJKIC,M.; MILETIC,Z.; JEMERSIC,L.;
LACKOVIC,G.;KOVSCA-JANJATOVIC,A.; ORSOLIC, N. Immunophenotyping
leukocytes subsets in peripheral blood and palatine tonsils of prefattening pigs.
Veterinary Research Communications, Amsterdam, v.26, n4, p. 273-283, 2002.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5 ed. Sao Paulo: Roca, 2002.

p.531.

THORN, C.E. Normal hematology of the pig. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap.168. p. 1089-1095.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. ; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. G.; LASSEN, E. D.; REBAR, A. H.; WEISER, M. G. **Veterinary Hematology & Clinical Chemistry**. 1 ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2004. 544p

VALLENGA L.; WENSING T.; BREUKINK H.J.; HAGENS F.H. effects of irradiated sow colostrums on some biochemical and hematological measurements in newborn piglets. **Research in Veterinary Science**, London, v.41,n.3, p. 316-318, 1986.

VILMER E., STERKERS G., RAHIMY C. HLA- mismatched cord-blood transplantation in a patient with advanced leukemia. **Transplantation**, Baltimore, v.53, n.5, p.1155-1157, 1992

WAGNER, J.E.; BROXMEYER H.E.; BYRD R.L.; ZEHNBauer B.;SCHMECKPEPER B.; SHAH N.; GRIFFIN C.; EMANUEL P.D.; ZUCKERMAN K.S; COOPER S. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloblastic therapy: analysis of engraftment. **Blood: The Journal of Haematology**, New York, v.79, n.7, p.1874-1881, 1992.

WALKA, M.M.; SONNTAG, J.; KAGE, A.; DUDENHOUSEN, J.W.; OBLADEN, M. Complete blood counts from umbilical cords of healthy term newborns by two automated cytometers. **Acta Haematologica**, Basel, v.100, n.4, p. 167-73. 1998.

WEISS, D.J. Flow cytometric evaluation of canine bone marrow based on intracytoplasmic complexity and CD45 expression. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, Santa Barbara, v. 33, n. 2, p. 96-101, 2004.

WHITTALL, J. T. D.; PARKHOUSE, R. M. E. Monoclonal Antibodies Defining Differentiation Antigens of Swine Lymphoid and Myeloid Cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.60, n.1-2, p.149-160. 1997.

WONG, A.; YUEN, P.M.P.; LI, K.; YU, A. L.M.; TSOI, W.C. Cord blood collection before and after placental delivery: levels of nucleated cells, haematopoietic progenitor cells, leukocyte subpopulations and macroscopic clots. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.27, n.2, p.133–138.2001.

XIAO, M.; OPPENLANDER, B.K.; PLUNKETT, J.M.; DOOLEY, D.C. Expression of Fl3 and-c-kit during growth and maturation of human CD34+ CD38- cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.27, n.5, p.916-927, 1999.

YAO C.L.; CHU I.M.; HSIEH T.B.; HWANG S.M. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.32, n.8, p.720–727,2004.

YEE, N.S.; HSIAU, C.W.; SERVE, H.; VOSSLER, K.; BESMER, P. Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, hosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.269, n.50, p.31991-31998, 1994.

YEH S.H.; TAI J.J.L.; CHANG H.L.; LEE C.J. Blood profile of Lanyu pigs in Taiwan. **Journal of Taiwan Livestock Research**, Taiwan, v.27,p. 187-195, 1994.

ZUCKERMMAN, F.A. ; HUSMANN R.J. Functional analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. **Immunology**, Oxford, v.87, n.3, p. 500-512, 1996.

ZUCKERMANN, F.A.; PEAVEY, C.; SCHNITZLEIN, W.M.; SCHABACKER, D.; YANG, H.; SAALMULLER, A.; LUNNEY, J.K. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD44: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.60, n.3-4,p.375–392, 1998.