

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

**QUANTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS
NO SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS ADULTOS E
SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS SEROPROTEICAS**

Lucas Alves de Souza Santana
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2012

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

**QUANTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS
NO SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS ADULTOS E
SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS SEROPROTEICAS**

Lucas Alves de Souza Santana

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Gírio

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Senter Magajevski

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2012

Santana, Lucas Alves de Souza
S232a Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue periférico
de cães saudáveis adultos e sua correlação com variáveis seroproteicas /
Lucas Alves de Souza Santana. – – Jaboticabal, 2012
xiii, 69 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Raul José Silva Gírio
Co-orientadora: Fernanda Senter Magajevski
Banca examinadora: Antonio Carlos Alessi, Raimundo Souza
Lopes, Ana Paula Massae Nakage Canesin, Maria Angélica Dias
Bibliografia

1. Linfócitos. 2. Citometria de fluxo. 3. Proteínas. 4. Soro. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.112:636.7

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

LUCAS ALVES DE SOUZA SANTANA – nascido em 18 de novembro de 1981, em Jaboticabal – São Paulo, é Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em dezembro de 2005. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Medicina Veterinária Preventiva, em fevereiro de 2008, sob orientação do Prof. Dr. Raul José Silva Gírio. No mesmo ano, orientado pelo Prof. Dr. Raul José Silva Gírio, ingressou no doutorado em Medicina Veterinária.

Dedico,

*Aos meus pais, Aureo e Vanete, pela sabedoria guardada na simplicidade
do “ser”, que, com a dedicação, o apoio e o incentivo, ensinaram-me o
verdadeiro caminho de uma vida mais humana.*

*Aos meus irmãos André e Junior e à sobrinha Laura, pelo carinho, apoio e
companheirismo que me dedicaram.*

*A Deus, pela oportunidade de encontrar pessoas tão especiais em minha
vida, que me guiaram até aqui.*

*Aos animais, que inocentemente foram os principais instrumentos desta
etapa de minha vida, pois sem eles nada disto seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Aureo, à minha mãe Vanete, aos meus irmãos André e Junior e à minha sobrinha Laura, pelo imenso amor e extraordinário exemplo de dedicação e esperança. Pelos fortes laços e torcida por esta importante vitória.

Ao Prof. Dr. Raul José Silva Gírio, meus agradecimentos sinceros, não só pela orientação mas também pelo apoio, pela amizade, pela compreensão e pela confiança.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal pela oportunidade concedida.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de Bolsa de Estudos.

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

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

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

Aos Professores Aparecido Antônio Camacho, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Maria Angélica Dias, Ana Paula Massae Nakage Canesin, Antônio Carlos Alessi e Raimundo Souza Lopes pelas contribuições imprescindíveis que me passaram na qualificação e na defesa de tese.

Ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pela dedicação, pelo carinho e pela amizade, além das sugestões na redação e execução da tese.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela disponibilidade e pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados.

Ao Dr. Paulo César da Silva, funcionário do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV/Unesp/Jaboticabal, pelo auxílio na realização das análises eletroforéticas.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pelo auxílio na identificação das proteínas no traçado eletroforético.

À Fabiana Rossetto de Moraes, responsável pelo Laboratório de Citometria de Fluxo da FCFRP-USP, pela colaboração para realização da técnica de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, à Prof. Dr. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, à Médica Veterinária Fátima Camacho e ao Médico Veterinário Sérgio Laffranchi, pela viabilização dos animais utilizados no presente ensaio.

À minha namorada, Andressa Pereira de Rosa, pelo amor e carinho incondicionais em todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus grandes amigos, Oliveira Caetano de Freitas Neto e André Marcos Santana, pelo apoio e amizade nos momentos de incerteza e dificuldade.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução do experimento e na minha formação pessoal e profissional durante a pós-graduação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Animais e grupos experimentais	20
4.2. Obtenção das amostras	20
4.3. Preparação das amostras	20
4.4. Avaliação do quadro hematológico periférico	21
4.5. Imunofenotipagem de linfócitos	21
4.6. Escolha dos marcadores	22
4.7. Titulação de anticorpos	23
4.8. Processamento das amostras para citometria de fluxo	24
4.9. Cálculo da quantidade de linfócitos de cada subpopulação	28
4.10. Proteínas séricas totais	28
4.11. Fracionamento eletroforético	28
4.12. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Eritograma	31
5.2. Leucograma	34
5.3. Imunofenotipagem de linfócitos	37
5.4. Proteinograma sérico	40
5.5. Teste de correlação de Pearson	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE	69

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo. Jaboticabal (SP), 2012.....	23
2. Preparação das amostras para análise citométrica. Jaboticabal (SP), 2012.....	24
3. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.....	32
4. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.....	35
5. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens de células CD5+CD8+, CD5+CD4+ e CD21+, por meio da citometria de fluxo, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.....	38

6. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para as concentrações séricas de proteína total (g/dL) e das frações proteicas (mg/dL), por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012..... 43
7. Subpopulações linfocitárias e suas correlações com as concentrações séricas das frações protéicas, albumina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina, IgA, IgG (cadeia pesada) e IgG (cadeia leve). Jaboticabal (SP), 2012..... 46

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representação esquemática da análise por citometria de fluxo no separador de células ativado pela fluorescência (FACS), mostrando a câmara de fluxo e os dispersores de luz, que separam as células por tamanho e granularidade (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).....	9
2. Ilustração da representação gráfica da leitura das células de acordo com o seu tamanho, complexidade e intensidade de fluorescência, discriminando as subpopulações de linfócitos CD5 ⁺ CD8 ⁺ e CD5 ⁺ CD4 ⁺ , no sangue periférico de cães, após aplicação da técnica citométrica.....	26
3. Ilustração da representação gráfica da leitura das células de acordo com o seu tamanho, complexidade e intensidade de fluorescência, discriminando a subpopulação de linfócitos CD21 ⁺ , no sangue periférico de cães, após aplicação da técnica citométrica.....	27
4. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.....	33

5. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012..... 36
6. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens de células CD5+CD8+, CD5+CD4+ e CD21+, por meio da citometria de fluxo, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012..... 39
7. Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães. Há 17 amostras de soro sanguíneo, sendo a amostra padrão (P) o espaço 7. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), albumina (65 KD), alfa-1-antitripsina (60 KD) e IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37KD). Ao final (F) do gel está a IgG (cadeia leve) (25 KD)..... 40
8. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) das frações protéicas, albumina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina, IgA, IgG (cadeia pesada) e IgG (cadeia leve), verificadas na SDS-PAGE, em cães Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012..... 44

QUANTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NO SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS ADULTOS E SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS SEROPROTEICAS

RESUMO – Atualmente, a citometria de fluxo está tornando-se uma ferramenta útil na Medicina Veterinária, particularmente na clínica de pequenos animais. O presente ensaio teve como objetivo imunomarcas as subpopulações linfocitárias $CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$, com a utilização de marcadores de superfície (anticorpos monoclonais), em quatro diferentes raças de cães domésticos e correlacionar esses dados com o eletroforetograma de proteínas séricas desses animais. Foram utilizados 40 cães adultos, machos e fêmeas, das raças Beagle, Golden Retriever, Bulldog Inglês e sem raça definida, divididos em 4 grupos, sendo 10 cães por grupo experimental. Os cães foram submetidos à avaliação clínica, hematológica (hemograma) e à análise quantitativa, no sangue periférico, das subpopulações de linfócitos $CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$. Paralelamente, foi realizada a análise qualitativa das proteínas séricas totais e suas frações. As proteínas séricas foram separadas por eletroforese em matriz de gel de poliacrilamida, e suas concentrações determinadas por densitometria computadorizada. O número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos T citotóxicos foi significativamente maior ($p<0,05$) nos Bulldogs Ingleses e cães SRD, comparativamente aqueles encontrados nos grupos Beagles e Golden Retrievers. Ademais, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos B foi significativamente maior ($p<0,05$) nos Bulldogs Ingleses, quando comparado àquele dos Beagles. No presente estudo, não foi possível estabelecer correlação entre as subpopulações linfocitárias analisadas e as proteínas totais e suas frações.

Palavras-Chave: linfócitos, citometria de fluxo, proteínas, soro

LYMPHOCYTE SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD OF ADULT HEALTHY DOGS AND ITS CORRELATION WITH SERUM PROTEINS

ABSTRACT – Flow cytometry is useful tool in veterinary medicine, particularly in small animal practice. The objective of this study was to determine lymphocyte subsets of CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ and CD21⁺ in four different breeds of domestic dogs and correlate these data with the electrophoretogram of serum proteins in these animals. A total of 40 adult dogs, males and females of Beagles, Golden Retrievers, English Bulldogs and crossbreed dogs were divided in four groups, with 10 dogs per experimental group. The dogs were submitted to clinical, hematological and quantitative analysis, in peripheral blood, of lymphocyte subsets of CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ and CD21⁺. Also we performed a qualitative and quantitative analysis of total serum protein and its fractions. The serum proteins were separated by electrophoresis in polyacrylamide gel matrix, and their concentrations were determined by computerized densitometry. The average number of cells obtained for the subsets of cytotoxic T lymphocytes was significantly higher ($p<0,05$) in the British Bulldogs and crossbreed dogs compared to those found in Beagles and Golden Retrievers. Furthermore, it was observed that the average number of cells obtained for the subsets of B lymphocytes was significavamente higher ($p<0,05$) in English Bulldogs compared to that of Beagles. In the present study, there was no correlation between lymphocyte subsets with total proteins and its fractions.

Palavras-Chave: lymphocytes, flow cytometry, serum, proteins

1. INTRODUÇÃO

A Hematologia Veterinária tem evoluído harmoniosamente nos últimos anos, suportada, dentre outros, pelo crescente interesse em relação à compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em distúrbios hematológicos tais como a anemia aplástica, as leucemias e os estados de imunodeficiência dos animais domésticos. Tais mecanismos estão relacionados, em princípio, ou com lesões das células tronco hematopoiéticas ou do meio microambiente indutivo (SANTANA, 1998), ou ainda, com distúrbios que perturbam outros sítios do sistema linfo-hematopoiético (GERSHWIN; KRAKOWA; OLSEN, 1995).

Tal celeridade dos avanços na hematologia tem sido possível, também, graças à tecnologia de produção de anticorpos monoclonais associados a fluorocromos e, adicionalmente, graças ao advento recente da técnica de citometria de fluxo, que permite analisar, simultaneamente, múltiplas propriedades celulares (STETLER – STEVENSON & BRAYLAN, 2001).

Atualmente, a determinação de subpopulações linfocitárias, no sangue periférico, e em outros tecidos, faz parte da rotina de testes laboratoriais utilizados em pacientes humanos com diagnóstico suspectivo de doenças linfoproliferativas e distúrbios do sistema de defesa imunitária específica. Da mesma maneira, a citometria de fluxo vem se firmando como uma ferramenta útil na prática médico-veterinária, particularmente na clínica de pequenos animais. Tal conhecimento tem ensejado o estabelecimento de valores fisiológicos para diferentes subpopulações linfocitárias, indispensáveis à compreensão da dinâmica da celularidade linfóide, em diversas situações patológicas (FALDYNA et al., 2001).

Em relação aos aspectos imuno-hematológicos em cães, vários autores fazem referência à distribuição fisiológica das subpopulações linfocitárias no sangue periférico (MOORE et al., 1992; DIRSCHERL et al., 1995; CHABANNE et al., 1995; GREELEY et al., 1996; FALDYNA e TOMAN, 1998; TIPOLD et al., 1998; BYRNE et al., 2000; JONES et al., 2000). BYRNE et al. (2000) asseveram que pequenas diferenças nos resultados,

reportados, por diferentes autores, podem ser explicadas em função das diferenças nos clones de anticorpos utilizados, raças estudadas, métodos de processamento das amostras e análise dos dados.

Neste sentido, e na expectativa de contribuir com os estudos precedentes, idealizou-se este ensaio com o escopo principal de quantificar as subpopulações linfocitárias $CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$, por intermédio da técnica citométrica, utilizando-se de anticorpos monoclonais, em cães domésticos e saudáveis, de quatro diferentes raças, e correlacionar tais achados com aqueles do eletroforetograma de proteínas séricas, dos referidos cães, de tal forma a agregar informações sobre o perfil imunológico das diferentes raças.

Vale ressaltar que, para que se possa compreender, a dinâmica do ensaio em questão, é relevante a discussão sobre hematopoiese e linfopoiese, bem como sobre aspectos relacionados com as técnicas de citometria de fluxo e eletroforese das proteínas séricas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Evolução Temporal da Hematopoíese

É fato bem estabelecido que durante a vida dos animais e dos seres humanos, há uma contínua produção e subsequente morte de células sanguíneas morfo e funcionalmente maduras, mantendo-se os compartimentos celulares sanguíneos relativamente constantes. Por conseguinte, semelhantemente a outros sistemas celulares de renovação rápida tais como os epitélios intestinal e cutâneo, o tecido hematopoiético requer uma população de células que persista durante toda vida e que possa realimentar o compartimento de células maduras, sempre que necessário. A supracitada população de células é constituída pelas células-tronco hematopoiéticas, reconhecidas como células primitivas pluripotentes, capazes de sofrer auto-renovação, proliferação e diferenciação nas diversas linhagens de células sanguíneas (JAIN, 1993).

Durante a vida intrauterina, as *stem cells* são encontradas no saco vitelínico embrionário e, posteriormente, deslocam-se, via hematógena, para o fígado, baço, linfonodos e timo do feto, expandindo, desta forma, os locais de formação das células do sangue. Por volta da metade do período de vida intrauterina, as cavidades medulares já se formaram no interior dos ossos e a hematopoiese passa a ocorrer dentro das cavidades ósseas, isto é, na medula óssea. A medula óssea torna-se o principal sítio de hematopoiese no final da vida intrauterina e produz granulócitos, monócitos, eritrócitos, megacariócitos e alguns linfócitos (JAIN, 1993). Na vida adulta, a medula óssea é o único sítio hematopoiético, para a maioria dos mamíferos, exceção feita aos roedores, cujo baço retém sua atividade hematopoiética, mesmo durante a fase de vida extrauterina (BROWN & GARTTEER, 1993). Entretanto, quando a medula óssea de mamíferos sofre lesões extensas, o fígado pode passar por um processo de metaplasia e reassumir seu potencial hematopoiético, fenômeno conhecido como hematopoíese extramedular, sem contudo substituir a atividade global da medula óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Linfopoiése no cão

Durante os períodos pré e pós-natal, a medula óssea produz, continuamente, células progenitoras linfóides que se deslocam para os órgãos linfóides primários ou centrais – o timo e a bursa, que se equivalem, respectivamente, em mamíferos e aves. Nestes sítios, pelo menos duas populações celulares, funcional e fenotipicamente diferentes, se desenvolvem – as precursoras de, respectivamente, células T (células pré-T) e B (células pré-B) (JAIN, 1993).

Destarte, o timo, a bursa de Fabricius e a medula óssea são coletivamente referidos como órgãos linfóides primários. Segundo JAIN (1993), PASTORET, GRIEBEL e BAZIN (1998) e TIZARD (2002), os órgãos linfóides centrais ou primários, fornecem, continuamente, precursores linfóides imaturos aos órgãos linfóides periféricos ou secundários (linfonodos, baço, placas de Peyer, linfonodos associados ao mediastino e mesentério), onde ocorre a proliferação e respectivo desenvolvimento de clones de linfócitos T e B, em resposta à estimulação antigênica adequada.

Acredita-se que o timo canino seja o principal sítio de desenvolvimento de células T (PASTORET; GRIEBEL; BAZIN, 1998). Este órgão é constituído, basicamente, de dois lóbulos principais e situa-se na região mediastínica cranial. Seu tamanho é variável de acordo com a idade do animal, sendo que seu peso absoluto é maior durante a puberdade (YAN & GAWLAK, 1989). Após esta fase púbere, o timo tende a involuir e atrofiar, porém, um remanescente tímico pode ser usualmente identificado em cães idosos (PASTORET; GRIEBEL; BAZIN, 1998). Os precursores linfóides originados na medula óssea, migram para o timo e começam a se diferenciar em timócitos sob a influência, principalmente, do microambiente epitelial tímico, dos hormônios timosina, timopoetina e timoestimulina e das interleucinas, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 e IL-7, produzidas na medula tímica (PASTORET; GRIEBEL; BAZIN, 1998; TIZARD, 2002). Os timócitos tornam-se, então, organizados em lóbulos bem definidos, distribuindo-se no córtex e na medula, sendo que, conforme asseverado por ROITT, BROSTOFF e MALE (2003), os timócitos corticais representam 85 – 90% das células,

enquanto que 10 a 15% representam timócitos medulares. Estudos relacionados à função e expressão de antígenos de superfície indicam que os timócitos corticais são menos maduros que os medulares (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). As células T medulares maduras deixam o timo e migram para áreas específicas, T – dependentes, do tecido linfóide periférico ou secundário, onde executam suas funções. O desenvolvimento de células T nos órgãos linfóides secundários é estimulado por várias interleucinas, dentre as quais, IL-1, IL-2, IL-4, IL-7 e IL-9 (JAIN, 1993).

Os linfócitos B, por sua vez, originam-se e amadurecem no seio da medula óssea antes de migrarem para os órgãos linfóides secundários (TIZARD, 2002). O processo de diferenciação de células pré-T no timo e pré-B na medula óssea, ocorre independentemente de estímulo antigênico (JAIN, 1993). Em contrapartida, a produção de células B na medula óssea, no baço e nos linfonodos é antígeno-dependente. A produção de linfócitos B na medula óssea é influenciada, principalmente, por interferon γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-7, enquanto que no tecido linfóide secundário, ela acontece sob o estímulo de interleucinas tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 (JAIN, 1993).

Função dos linfócitos na resposta imune

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

O sistema imunológico adaptativo ou específico é ativado se a primeira linha de defesa for ultrapassada e envolve a geração de uma resposta produzida por células linfocitárias. Esse sistema produz, portanto, uma reação antígeno-específica, capaz de reconhecer e montar uma resposta imunológica contra os antígenos de tal forma a

materializar um padrão de resposta celular, mediada por linfócitos T; ou humoral, mediada por linfócitos B, neste caso responsável pela produção de anticorpos (TIZARD, 2002).

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

Em princípio, o “pool” linfocitário é dividido em linfócitos T e B. Os linfócitos T são, por sua vez, agrupados em duas principais subpopulações segundo a expressão dos antígenos CD4 e CD8, que têm um papel importante como moléculas de diferenciação. Tais antígenos de superfície acham-se, atualmente, melhores caracterizados por anticorpos monoclonais em humanos e roedores de laboratório, mas seus homólogos também têm sido caracterizados em animais domésticos tais como caninos, equinos, bovinos e felinos (LUNN; HOLMES; DUFFUS, 1991). As populações e subpopulações de linfócitos podem ser definidas anatomicamente, por suas vias de desenvolvimento; histologicamente, pela distribuição dentro dos tecidos linfóides; funcionalmente, por seus papéis dentro da resposta imune; e, fenotipicamente, através da expressão de suas moléculas de superfície (DAY, 2000).

Moléculas de superfície das células linfocitárias

Os linfócitos possuem, em sua superfície, estruturas importantes denominadas receptores antigênicos (TIZARD, 2002). Os linfócitos T são definidos pela expressão do receptor de antígenos das células T (TCR), que confere uma especificidade antigênica única à célula (DAY, 2000). Alguns destes receptores aparecem em estágios particulares da diferenciação celular ou quando as células são ativadas por curto período, enquanto outras são características de linhagens celulares distintas entre si. Tais moléculas podem ser usadas para distinguir populações e subpopulações

celulares, sendo então chamadas de marcadores. Muitas destas moléculas podem ser identificadas com o uso de anticorpos monoclonais específicos. Uma nomenclatura sistematizada foi estabelecida para as moléculas de superfície – o sistema CD, no qual os marcadores são numerados CD1, CD2, etc (ROITT; BRASTOFF; MALE, 2003; TIZARD, 2002). O termo CD (*Cluster Designation* = denominação de grupamento) é derivado da análise, por computador, dos anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo, contra antígenos leucocitários humanos (ROITT; BRASTOFF; MALE, 2003; TIZARD, 2002). Em relação aos anticorpos monoclonais que marcam os antígenos leucocitários caninos, estes foram definidos durante o “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (First CLAW – First Canine Leukocyte Antigen Workshop), ocorrido em Cambridge (U.K.) em 1993 (COBBOLD & METCALFE, 1994).

Os linfócitos T, no sangue circulante, constituem a maioria (60 – 85%) dos linfócitos. As categorias descritas, incluem aquelas responsáveis por funções do tipo auxiliar, citotóxica/supressora ou de memória (JAIN, 1993). No supracitado *Workshop*, definiu-se o CD5 como o principal marcador de superfície para as células linfocitárias pan-T caninas, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e, finalmente, o CD8 como o marcador de subpopulação de célula linfocitária T citotóxica (COBBOLD & METCALFE, 1994). Ademais, os retromencionados autores reportam que as células T auxiliares caninas, CD4⁺, expressam a glicoproteína Lyt-1 e reconhecem antígenos quando associadas às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC II), enquanto que, a molécula CD8, presente na subpopulação de células T citotóxicas ou supressoras, reconhece antígenos associados às moléculas MHC de classe I. Segundo VAN EWIJK (1991), a expressão das moléculas de superfície CD4 e CD8 dos diferentes linfócitos T é precocemente identificada no córtex tímico. A subpopulação de células T CD5⁺/CD4⁺ responde por 40% dos linfócitos sanguíneos caninos enquanto que a CD5⁺/CD8⁺ perfaz cerca de 22%, aproximadamente (TIZARD, 2002).

Diferentemente das células T, os linfócitos B representam uma pequena proporção dos linfócitos circulantes (5 – 15%) e, são classicamente relacionados com a produção endógena de imunoglobulinas (JAIN, 1993; TIZARD, 1998). Em relação aos marcadores de superfície dos linfócitos B, vários antígenos de diferenciação foram caracterizados nos murinos e na espécie humana. Assim, COBBOLD e METCALFE (1994), GERSHWIN, KRAKOWKA e OLSEN (1995), ROITT, BRASTOFF e MALE (2003) e TIZARD (2002), reportam que as células B maduras possuem um receptor de superfície para a proteína C3d do sistema complemento, o qual foi designado de marcador CD21.

Técnica citofluorométrica

O citômetro é um separador de células ativado por fluorescência (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorter), que mede a intensidade de fluorescência de cada célula. As células são separadas de acordo com a sua fluorescência característica (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003; NAKAGE et al., 2005).

As células, em suspensão, são marcadas com anticorpos específicos, conjugados com fluorocromos para detecção de moléculas de superfície e são introduzidas em uma câmara de fluxo. O fluxo de células que atravessa a câmara está suspenso em uma solução tampão, sendo que 500 a 4000 células ou partículas passam em fila única, por segundo, através de um sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por laser argônio, que tem uma energia de luz incidente de 488 nm. Cada célula é avaliada com relação ao tamanho (feixe de luz frontal) e granularidade e complexidade interna (feixe de luz lateral), bem como para a intensidade de fluorescência para detecção de diferentes marcadores de superfície (imunofenotipagem). A técnica de citometria de fluxo permite, portanto, identificar e quantificar células em suspensão com base no tamanho ("Forward scatter" – FSC), na granularidade ("Side scatter" – SSC) e na intensidade de fluorescência dessas células (Figura 1) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

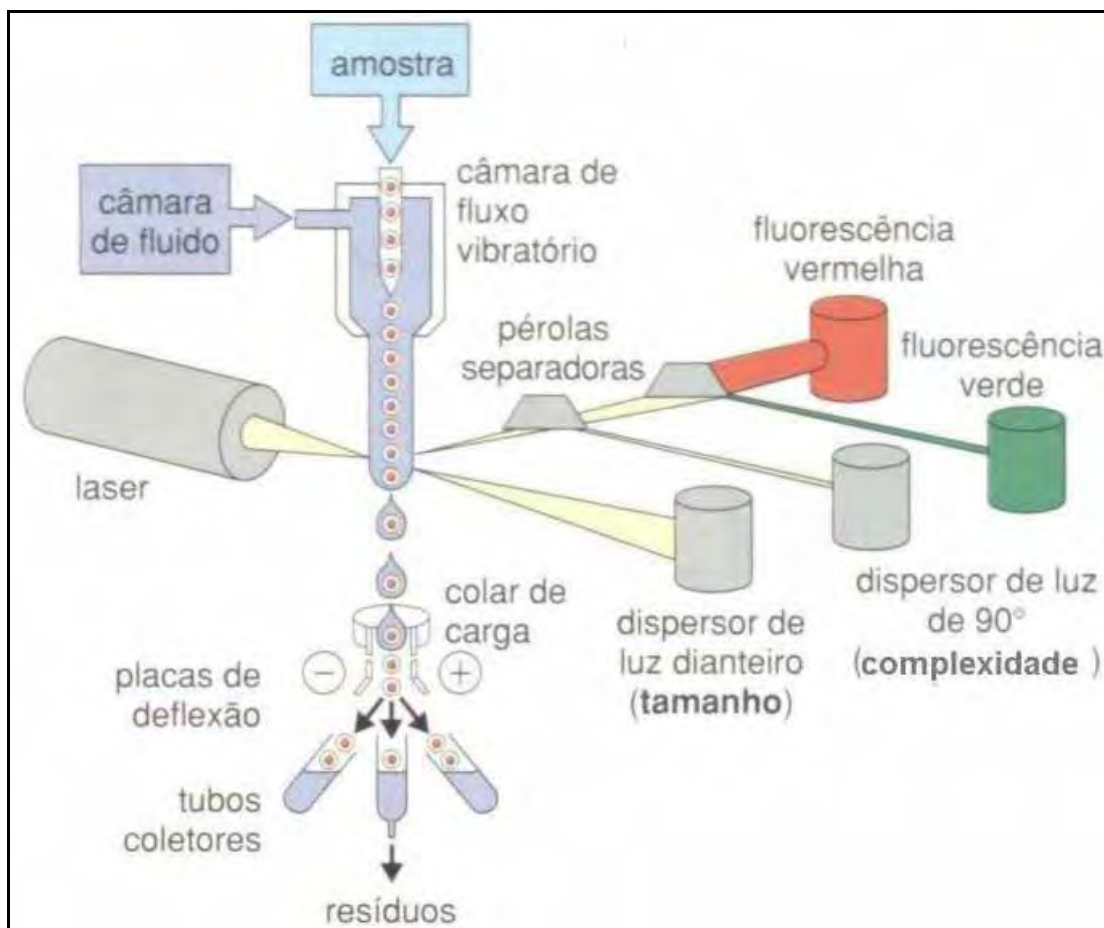


Figura 1. Representação esquemática da análise por citometria de fluxo no separador de células ativado pela fluorescência (FACS), mostrando a câmara de fluxo e os dispersores de luz, que separam as células por tamanho e granularidade (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Preparo das amostras

Para a preservação e melhor recuperação das subpopulações linfocitárias T $CD4^+$ e T $CD8^+$ o método recomendado para o preparo das amostras inclui a lise das hemácias, pois os métodos de separação de células linfocitárias por gradiente de densidade pelo Ficoll ou Histopaque requerem maior volume de sangue (PAXTON et al., 1989; RIDINGS et al., 1996).

Por outro lado, BYRNE et al. (2000) observaram que a separação de leucócitos do sangue periférico total, através do método da lise das hemácias, produziu debris que dificultam a padronização. Já FALDYNA et al. (2001), afirmaram que a lise das hemácias deve ser o método de escolha, principalmente nos casos em que há limitação quanto à quantidade de sangue colhida.

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

Imunofenotipagem de linfócitos

A fenotipagem de linfócitos, obtida por intermédio da citometria de fluxo, tem sido empregada no estudo de subpopulações linfocitárias na vigência de alguns estados patológicos e/ou nas alterações do sistema imune. Na prática médico-veterinária essa técnica tem sido utilizada para avaliar a progressão das infecções pelos vírus da Imunodeficiência Felina e da Leucemia Felina, na resposta de transplantes de órgãos, em modelos experimentais caninos, bem como na resposta imune a infecções (BYRNE et al., 2000; DIAS, 2003; NAKAGE & SANTANA, 2006; NAKAGE et al., 2009). Anticorpos monoclonais que reconhecem linfócitos têm sido úteis no diagnóstico e avaliação da imunodeficiência, na terapia imunossupressora em transplantes de órgãos e doenças imunes, e na quimioterapia de leucemias e linfomas (RIVAS et al., 1996; COLETA, 2009; MIOTTO, 2009).

Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha para a citometria de fluxo devido a sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). De outra parte, anticorpos monoclonais não são totalmente sensíveis ou específicos, portanto é recomendado o uso de dois ou mais marcadores para a determinação de linhagem celular (CAREY & HANSON, 1994).

Para a devida quantificação das subpopulações linfocitárias, a citometria de fluxo deve ser precedida pelas contagens total e diferencial dos leucócitos. Os valores absolutos para subpopulações linfocitárias são obtidos com base nas suas porcentagens à citometria, nas contagens globais dos leucócitos e na contagem relativa dos linfócitos, obtida no leucograma (BYRNE et al., 2000; GODOY et al., 2007).

Proteínas Séricas Totais

As proteínas são substâncias essenciais à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica sob a forma de anticorpos (JAIN, 1993; KANEKO et al., 2008).

As proteínas séricas totais compreendem a albumina e globulinas sem o fibrinogênio, pois este é totalmente consumido na formação do coágulo sanguíneo. Já as proteínas plasmáticas totais compreendem a albumina, globulinas e fibrinogênio. A albumina e todas as outras proteínas, com exceção das imunoglobulinas, são sintetizadas pelo fígado, incluindo o fibrinogênio e as α -globulinas. As imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE) são sintetizadas pelos plasmócitos e linfócitos B no tecido linfóide em resposta à estimulação antigênica, e estão incluídas nas frações beta e gamaglobulinas (ECKERSALL, 2008).

Em animais com distúrbios na homeostase devido à infecção, inflamação, injúria tecidual, neoplasia ou desordem imunológica, há uma resposta de fase aguda inespecífica. Esta resposta compreende alterações na concentração de algumas proteínas séricas referidas como proteínas de fase aguda (PFA). Quando uma PFA apresenta sua concentração aumentada no soro ou plasma é considerada uma proteína de fase aguda positiva (alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e haptoglobina), e quando sua concentração está diminuída é considerada uma proteína de fase aguda negativa (pré-albumina, albumina e transferrina). As PFA positivas são glicoproteínas produzidas e liberadas pelos hepatócitos a partir de estímulo pecífico de

citocinas (IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral – TNF – α) (GRUYS et al., 1994; KANEKO et al., 2008; ECKERSALL, 2008).

Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas), obtidas por eletroforese, representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico (KANEKO et al., 2008).

Eletroforese de Proteínas Séricas

A eletroforese é uma técnica na qual os diferentes tipos de proteínas séricas ou plasmáticas são separados, tornando possível a determinação de suas proporções relativas em uma dada amostra. Em um pH alcalino, o soro ou o plasma, após aplicado num suporte de gel de poliácridamida ou outro meio, é submetido a um campo elétrico que propicia a migração de suas diferentes frações de proteínas em diferentes velocidades, em direção ao ânodo. Após coloração, tais frações aparecem como bandas de intensidade de cor variável, que podem ser escaneadas por um densitômetro computadorizado para produzir uma curva eletroforética (THOMAS, 2000; ECKERSALL, 2008).

A albumina migra com maior rapidez e aparece como um pico alto e distinto em uma das pontas da curva, geralmente localizada à esquerda. Além da albumina, estão arranjadas as globulinas, alfa, beta e gama (α , β e γ) e, em muitos casos, cada uma delas pode ser claramente subdividida em duas bandas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 e γ_2). A aparência do traçado eletroforético pode ser distinta em doenças específicas, como por exemplo, nos casos de hipoalbuminemia e gamopatias policlonais e monoclonais (BUSH, 2004; ECKERSALL, 2008).

A eletroforese permite uma avaliação aproximada das concentrações de várias proteínas importantes, cujas alterações estruturais; seja de regulação de suas sínteses, ou de seu maior consumo; podem refletir nos seus traçados eletroforéticos ou nas suas concentrações (KANEKO et al., 1997; NAOUM et al., 1999; FELDMAN, 2000).

O eletroforetograma das proteínas pode ser obtido utilizando-se de soro ou plasma. O soro geralmente é preferido, pois o fibrinogênio do plasma pode tornar obscuro o eletroforetograma na região β - γ . Na eletroforese, as proteínas são separadas de acordo com suas taxas de migração em um campo elétrico que, por sua vez, dependem da carga e tamanho da proteína, da força do campo elétrico e do meio no qual as proteínas migram. A taxa de migração das proteínas pode ser afetada pelo pH, força iônica e composição do sistema tampão usado (KANEKO et al., 2008; THOMAS, 2000).

Entre os meios disponíveis para fracionamento das proteínas em laboratórios clínicos, existem as eletroforeses em acetato de celulose, gel de agarose, papel, gel de amido e gel de poliacrilamida (NAOUM et al., 1999).

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, necessitando apenas microquantidades de amostra (GORDON, 1995). Esta técnica tem sido utilizada para obtenção do proteinograma em diversas espécies (FAGLIARI et al., 1998; FAGLIARI e SILVA, 2002; FAGLIARI et al., 2003).

Em cães saudáveis, o traçado eletroforético das proteínas séricas consiste no pico agudo de albumina, primeira proteína a migrar em direção ao ânodo, seguida pela alfa-1 e alfa-2-globulinas, beta-1 e beta-2-globulinas, gama-1 e gama-2-globulinas (KANEKO et al., 2008).

A albumina corresponde a 60% da concentração total de proteínas, portanto, é a proteína mais abundante no plasma (KANEKO et al., 2008). A albumina é sintetizada nos ribossomos dos hepatócitos, transferida para o retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso e complexo de golgi, através da membrana dos sinusóides (PRINSEN & SAIN-VAN der VELDEN, 2004). A albumina aparece no citoplasma dos hepatócitos como um precursor chamado pré-albumina (KANEKO et al., 2008). A taxa de albumina sintetizada é controlada pela pressão coloidosmótica, embora ela possa ser influenciada por hormônios tais como a insulina, tiroxina e cortisol (EVANS, 2002).

Somente cerca de 30 a 40% da albumina está no sangue, o restante está no espaço intersticial. Músculos, fígado e rins são os principais colaboradores para o catabolismo da albumina com 40 a 60% da albumina total metabolizada nesse tecidos (PRINSEN & SAIN-VAN der VELDEN, 2004).

Além da manutenção da pressão coloidosmótica, a segunda principal função da albumina é o transporte de substâncias. Diversos metabólitos no sangue se ligam à albumina, e essa união auxilia o transporte de substâncias que são solúveis em meio aquoso e também evita perdas, através do rim, de importantes moléculas pequenas. Assim, ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, óxido nítrico e íons circulam com a albumina (EVANS, 2002; KANEKO et al., 2008).

A fração alfa é a que migra mais rapidamente de todas as globulinas e, na maioria das espécies, exceto nos ruminantes, desdobra-se nas subfrações alfa-1 e alfa-2. As proteínas mais importantes destas subfrações são as alfalipoproteínas (lipoproteína de alta densidade – HDL), que migram como alfa-1, as pré-betalipoproteínas (lipoproteína de densidade muito baixa – VLDL) e haptoglobinas, as quais migram na região de alfa-2. Na região alfa também são registradas globulina-tiroxina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitrombina III, alfa-2-macroglobulina e a ceruloplasmina (TRUMEL et al., 1996; KANEKO et al., 2008; ECKERSALL, 2008).

A haptoglobina é uma glicoproteína composta de subunidades 2-alfa e 2-beta, com a subunidade alfa tendo peso molecular de 16 a 23 KD (kilodáltons) e a subunidade beta de 35 a 40 KD. A haptoglobina é uma alfa-2-globulina e, forma um complexo protéico com a hemoglobina livre plasmática que é removido, posteriormente, por fagocitose realizada por células do sistema mononuclear fagocitário (BOWMAN, 1992; NAOUM et al., 1999; YANG et al., 2003).

O perfil de fase aguda da haptoglobina difere entre as espécies animais. Em caninos, felinos, equinos e suínos, o nível normal é de 0,1g/dL a 0,2g/dL, entretanto, durante doenças inflamatórias e infecciosas ela pode aumentar para 0,5g/dL ou mais (ECKERSALL, 2008).

A alfa-1-antitripsina (AAT) é o componente mais importante entre os “inibidores de proteases”, que é um grupo de proteínas com a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante um processo inflamatório agudo. Desta forma, sua síntese é estimulada durante a resposta inflamatória aguda. O aumento da AAT é característico das hepatopatias crônicas e agudas, porém tende a diminuir na cirrose (NAOUM et al., 1999) e também aumenta na doença pulmonar crônica (KANEKO et al., 2008).

A alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) é uma alfa-1-globulina, porém não é um “inibidor das proteases” como a AAT, e sua concentração sérica altera-se significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1989). A habilidade da AGP em se ligar a substâncias de baixo peso molecular pode ter uma função de proteção geral, tal como a ligação a lecitinas e endotoxinas. A AGP também tem várias funções na defesa inata contra infecção e modulação da resposta imune. Ela pode inibir a ligação do *Mycoplasma pneumoniae* aos macrófagos alveolares e pode inibir alguns vírus de influenza. Além disso, fagocitose, ativação de neutrófilos e agregação plaquetária são inibidos pela alfa-1-glicoproteína ácida, e ela parece exercer algum papel na maturação de linfócitos B e T (ISRAILI & DAYTON, 2001).

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva que se desloca para a região da alfa-2-globulina (KANEKO et al., 2008). A ceruloplasmina aumenta nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários, enquanto o decréscimo é observado ao nascimento, na desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias hepáticas associadas à intoxicação por cobre, e a sua meia vida é de aproximadamente quatro dias (JAIN, 1993).

As betaglobulinas fracionam-se em beta-1 e beta-2, na maioria dos animais domésticos, exceto nos ruminantes. Algumas proteínas importantes que compõem tais subfrações são aquelas do complemento (C3 e C4), hemopexina, transferrina, ferritina, proteína C-reativa e fibrinogênio. As imunoglobulinas IgM e IgA, prolongam-se da região beta-2 para gama-2. Cabe lembrar que na região beta existem também as beta-2-

lipoproteínas (lipoproteína de baixa densidade – LDL) e o plasminogênio (ECKERSALL, 2008).

A fração gama também se divide em duas subfrações, gama-1 e gama-2. As imunoglobulinas IgA, IgM e IgE são encontradas primariamente na região gama-1 e a IgG na região gama-2 (KANEKO et al., 2008). Segundo BUSH (2004), a IgA localiza-se na região beta-2. A concentração de gamaglobulinas aumenta com a estimulação antigênica, especialmente nas infecções crônicas e doenças autoimunes (BUSH, 2004).

O reconhecimento de antígeno é o ponto alto da resposta imune adaptativa específica, e dois tipos de moléculas estão envolvidas nesse processo, as imunoglobulinas e os receptores de antígenos da célula T. As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas presente no soro e fluidos teciduais de mamíferos. Algumas imunoglobulinas estão localizadas nas superfícies das células B onde funcionam como receptores, enquanto outras estão livres no sangue e na linfa (ROITT et al., 2003).

As imunoglobulinas agem como anticorpos e são produzidas em resposta a antígenos. Elas são altamente específicas e somente um antígeno determinante está envolvido. Naturalmente, entretanto, determinados antígenos múltiplos estão comumente envolvidos. Destarte, as células linfocíticas exercem uma função central no sistema imune. Há cinco classes de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, que tem sido identificadas em humanos, mas na maioria das espécies domésticas somente a IgG, IgA, IgM e IgE são evidentes, ainda que a IgD possa ser, raramente, expressada (GORMAN & HALLIWELL, 1989).

A IgA existe primariamente em duas formas, como um monômero (160 KD) no sangue e na forma secretória como um dímero (390 KD). Menos comumente, a IgA pode ocorrer na forma de polímero. Em animais domésticos, a IgA é importante como anticorpo secretório do trato intestinal e dos pulmões. Ela é capaz de neutralizar vírus e prevenir aderências de patógenos bacterianos aos tecidos alvo. Ela não tem a função de opsonização e é incapaz de se fixar ao complemento (GERSHWIN, 2008). A IgA está presente nas secreções externas (lágrima, saliva, secreções respiratórias,

gastrointestinais e genitourinárias) em muitas espécies animais, sendo importante para defesa local e proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral (JAIN, 1993).

As IgGs são as principais imunoglobulinas encontradas no sangue e são responsáveis pela imunidade humoral do organismo. Estas apresentam várias atividades biológicas, incluindo opsonização, aglutinação e fixação de complemento (JAIN, 1993).

No soro, a IgG, classe de anticorpos com maior concentração, aproximadamente 1 a 2g/100mL, apresenta algumas diferenças entre as espécies (TIZARD, 2008). As subclasses de IgG são conhecidas na maioria das espécies. A IgG tem uma estrutura de cadeia de quatro polipeptídeos com um peso molecular total de 180 KD. As cadeias pesadas de IgG são chamadas de cadeia gama e são únicas para IgG. A IgG auxilia na defesa do hospedeiro porque ela pode estar no sistema vascular e distribuir-se por todo o compartimento do fluido extravascular tecidual, onde ela possui muitas funções de proteção (GERSHWIN, 2008).

A imunoglobulina E (IgE) é um anticorpo que aumenta nas alergias e anafilaxias. Já, a imunoglobulina M (IgM) é um anticorpo formado precocemente em resposta à agentes inespecíficos. Esta globulina aumenta nas doenças inflamatórias, nas reações celulares primárias e na macroglobulinemia (ECKERSALL, 2008).

Relação Albumina:Globulina (A:G)

É comum mensurar as concentrações de proteína total e de albumina e admitir que a diferença entre elas representa a concentração de globulinas. A partir dessas concentrações, pode ser calculada a relação albumina:globulina (A:G). A comparação cuidadosa das frações de albumina e globulina derivadas da eletroforese, apresenta maior sensibilidade (ECKERSALL, 2008).

As alterações nas concentrações de proteína total se devem, primariamente, ao aumento ou à diminuição na concentração de albumina, sendo que as alterações na

concentração de globulinas repercutem mais discretamente na taxa de proteína sérica total (ECKERSALL, 2008).

Disproteinemias são anormalidades quantitativas e qualitativas nas concentrações de proteínas plasmáticas e, neste caso também, o método indicado para avaliação global do quadro protéico é a eletroforese. O perfil eletroforético das proteínas séricas e o cálculo dos valores absolutos das frações protéicas fornecem bases excelentes para um diagnóstico presumível em medicina de animais domésticos e selvagens. O estabelecimento do perfil eletroforético das frações protéicas séricas em conjunto com a relação A:G fornece subsídios para interpretação de diversas discrasias protéicas (ECKERSALL, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Quantificar as subpopulações linfocitárias ($CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$), no sangue periférico, de cães hípidos, de diferentes raças, utilizando-se de anticorpos monoclonais e da técnica de citometria de fluxo.

3.2. Quantificar e qualificar as proteínas séricas totais e suas frações, em matriz de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.3. Correlacionar os achados obtidos à citometria de fluxo com aqueles do eletroforetograma.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Jaboticabal, sob o protocolo número 027747/11, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 40 cães adultos, com idades que variavam de dois a sete anos, machos ou fêmeas, das raças Beagle, Golden Retriever, Bulldog Inglês e sem raça definida, distribuídos em quatro grupos, sendo dez cães por grupo experimental. Os cães foram obtidos junto ao canil do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp/Jaboticabal; da colônia da Associação Brasileira de Amigos da Distrofia Muscular de Ribeirão Preto, SP; e de canis particulares das cidades de Jaboticabal e Matão. O estado de saúde foi confirmado previamente ao início do experimento por meio de exames físicos, hematológicos e coproparasitológicos.

4.2. Obtenção das amostras

As colheitas de sangue foram realizadas por venipunção jugular, utilizando-se sistema de frascos a vácuo, contendo ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K_2 -EDTA), para realização do hemograma e da citometria de fluxo. Frascos sem anticoagulante e com paredes siliconizadas foram utilizados para obtenção de soro e consecução do eletroforetograma. As amostras foram devidamente identificadas e mantidas refrigeradas durante o transporte até o laboratório.

4.3. Preparação das Amostras

O hemograma e o processamento das amostras para citometria de fluxo foram realizados imediatamente após a colheita das mesmas. Os tubos siliconizados, contendo sangue total sem anticoagulante, foram submetidos à centrifugação por 5 minutos, à 1.257, 6 g (2500 rpm), para obtenção do soro. Ato contínuo, o soro sanguíneo foi envasado e armazenado em microtubos (2 mL), e mantidos sob congelamento a -20°C, até o momento da análise eletroforética.

4.4. Avaliação do quadro hematológico periférico

O sangue periférico dos cães foi submetido a estudos laboratoriais, incluindo contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina, todos com o auxílio do contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX – São Paulo/Brasil). A partir dos valores obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina, calcularam-se o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com Metanol, May-Grunwald e Giemsa (MMG), enumerando-se 100 células e estabelecendo-se as fórmulas leucocitárias relativa e absoluta. Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp (LPCV do HVGLN da FCAV/Unesp/Jaboticabal).

4.5. Imunofenotipagem de linfócitos

Os cães foram submetidos à análise quantitativa de células $CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$. A imunofenotipagem foi obtida por citometria de fluxo, que permite análise rápida, objetiva e quali-quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001), por meio da identificação e quantificação de células com base no tamanho, na granularidade e na intensidade de fluorescência (ROITT et al., 1999).

4.6. Escolha dos marcadores

Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). No “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (First CLAW – First Canine Leukocyte Antigen Workshop), ocorrido em Cambridge, Reino Unido, em 1993, foram definidos os anticorpos monoclonais que marcam os antígenos leucocitário caninos (COBBOLD e METCALFE, 1994). Neste evento o CD5 foi definido como principal marcador de superfície para células linfocitárias pan-T caninas, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e o CD8 como marcador de linfócitos T citotóxicos (COBBOLD e METCALFE, 1994). De acordo com BYRNE et al. (2000), os linfócitos B de cães, diferentemente daqueles de humanos e de roedores, não expressam CD5. Portanto, o CD5 canino deve ser utilizado como marcador para células pan-T. Os linfócitos têm sido mais extensivamente estudados com respeito à expressão diferencial de antígenos. A maioria dos linfócitos T são indentificados pela expressão dos antígenos CD4 e CD8 (LAYNER, 2002).

No cão, o CD4 é expresso pelo MHC de classe II restrito a células T-helper. Os neutrófilos caninos podem expressar CD4 e isto difere os neutrófilos caninos dos neutrófilos de outras espécies. Monócitos, macrófagos e células dendríticas também podem expressar este antígeno em algumas situações. O CD5 é expresso por células T maduras, timócitos e algumas células B. Nas células T maduras, o CD5 atua como co-estimulador de receptor de sinais. O CD8 é expresso pelo MHC de classe I restrito a células T-citotóxicas, porém algumas células NK podem expressar o CD8. Já o CD21 é expresso por células B maduras e células dendríticas foliculares no centro germinativo (VERNAU, 2004).

Diante do exposto, neste estudo foi utilizado para marcar os linfócitos T helper, o CD4, considerando que este age como receptor de células T para moléculas de MHC de classe II além de exercer um papel-chave no reconhecimento de antígeno processado por parte das células T auxiliares. Todavia, como esta molécula é expressa também em neutrófilos de cães, optou-se pela dupla marcação com a molécula CD5

para selecionar mais especificamente as células T auxiliares (TIZARD, 2002; AbD Serotec, 2008).

Para marcar os linfócitos T citotóxicos utilizou-se o CD8, que é um receptor para moléculas de MHC de classe I e exerce papel-chave no reconhecimento de antígenos endógenos. O anticorpo utilizado no presente estudo se liga ao CD8a. Para uma marcação mais fidedigna dos linfócitos T citotóxicos, utilizou-se também dupla marcação com o CD5 (TIZARD, 2002; AbD Serotec, 2008).

Para marcação dos linfócitos B, utilizou-se o CD21, um receptor de complemento chamado de CR2, uma glicoproteína de 145KDa encontrada nas células B. Embora TIZARD (2002) afirme que esta molécula também está presente em algumas células dendríticas e em algumas células T, o fabricante não faz nenhuma referência a este fato. Em resumo, os anticorpos monoclonais selecionados para a presente pesquisa encontram-se caracterizados na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo. Jaboticabal (SP), 2012.

Molécula	Fluorescência	Nome do anticorpo	Tipo Celular	Fabricante
Rat anti dog CD5	Alexa Fluor®647	MCA1037A647	Linfócitos T	AbD Serotec
IgG2a	Alexa Fluor®647	MCA1212A647	Isotipo controle	AbD Serotec
Rat anti dog CD4	PE	MCA1038PE	Linfócitos T helper	AbD Serotec
IgG2a	PE	MCA1124PE	Isotipo controle	AbD Serotec
Rat anti dog CD8	FITC	MCA1039F	Linfócitos T citotóxicos	AbD Serotec
IgG1	FITC	MCA1123F	Isotipo controle	AbD Serotec
Mouse anti dog CD21	PE	MCA1781PE	Linfócitos B	AbD Serotec
IgG1	PE	MCA928PE	Isotipo controle	AbD Serotec

4.7. Titulação dos anticorpos

A fim de avaliar a melhor concentração de anticorpo para utilização na citometria de fluxo, concentrações crescentes de cada anticorpo utilizado foram acrescidos a um

volume fixo de sangue, proveniente de um cão em boas condições de saúde. Para tal finalidade foram empregadas concentrações crescentes de anticorpo (2, 5 e 10 μL) em um volume de 100 μL de sangue.

4.8. Processamento das amostras para citometria de fluxo

As amostras foram processadas no LPCV do HVGLN da FCAV/Unesp/Jaboticabal, utilizando-se de cinco tubos falcon, preparados como descrito na Tabela 2. Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a colheita do sangue.

Tabela 2. Preparação das amostras para análise citométrica. Jaboticabal (SP), 2012.

Tubo	Amostra	Volume	Anticorpos	Fluorescência
1	100 μL	-	-	-
2	100 μL	2 μL	IgG2a	Alexa Fluor®647
		2 μL	IgG2a	PE
		2 μL	IgG1	FITC
3	100 μL	2 μL	Anti-CD5	Alexa Fluor®A647
		2 μL	Anti-CD4	PE
		2 μL	Anti-CD8	FITC
4	100 μL	2 μL	IgG1	PE
5	100 μL	2 μL	Anti-CD21	PE

As amostras eram homogeneizadas e os tubos incubados no escuro, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS – Lysing Solution – Becton Dickinson) era adicionado em cada tubo e, novamente, as amostras eram homogeneizadas e incubadas por dez minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente era realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por três vezes, adicionando-se dois mililitros de PBS por lavagem. Após as lavagens, eram

adicionados 0,2 mL de solução de formol a 1% em salina tamponada com fosfato 0,01M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS).

As amostras foram analisadas no citofluorômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), no Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Farmácia da USP, *Campus* de Ribeirão Preto. Utilizou-se o programa FACSDiva (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), para identificar e quantificar as células CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ e CD21⁺, que forneceu o histograma e respectiva tabela com a quantidade de células detectadas pela imunofenotipagem (Figura 2).

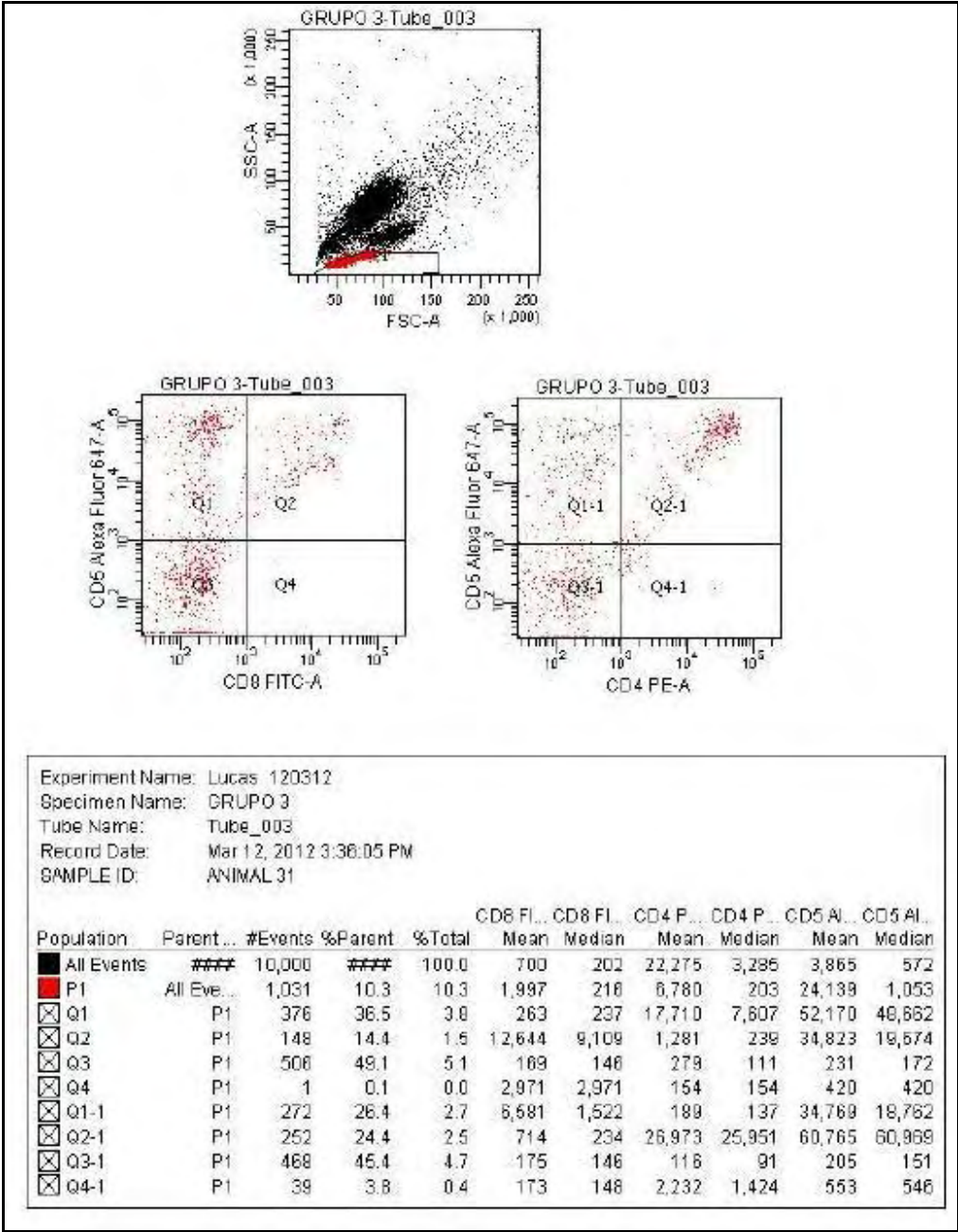


Figura 2. Ilustração da representação gráfica da leitura das células de acordo com o seu tamanho, complexidade e intensidade de fluorescência, discriminando as subpopulações de linfócitos CD5⁺CD8⁺ e CD5⁺CD4⁺, no sangue periférico de cães, após aplicação da técnica citométrica.

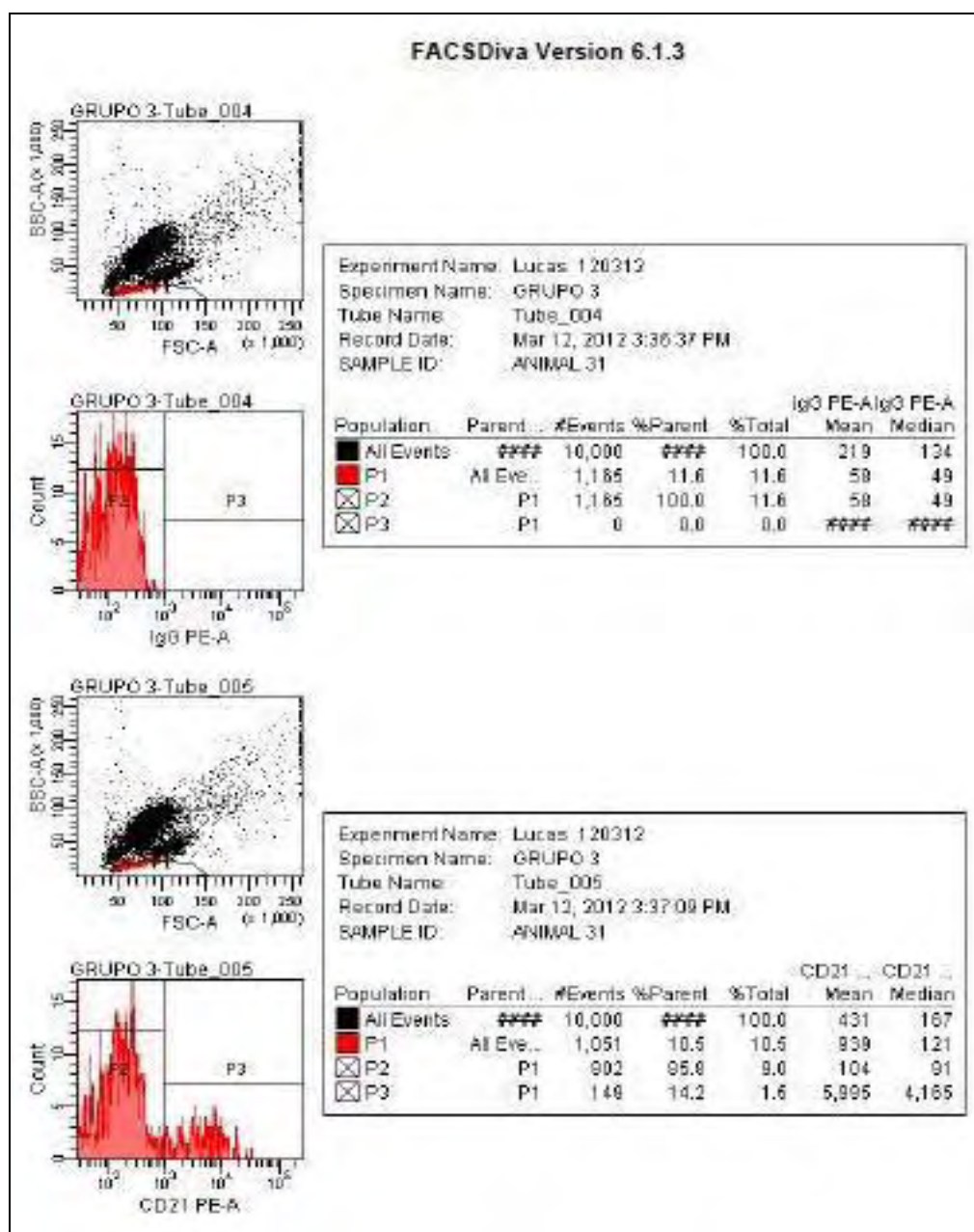


Figura 3. Ilustração da representação gráfica da leitura das células de acordo com o seu tamanho, complexidade e intensidade de fluorescência, discriminando a subpopulação de linfócitos CD21⁺, no sangue periférico de cães, após aplicação da técnica citométrica.

4.9. Cálculo da quantidade de linfócitos de cada subpopulação

As contagens de CD5⁺CD4⁺/μL, CD5⁺CD8⁺/μL e CD21⁺/μL, foram estabelecidas pela seguinte fórmula:

$$\text{Subpopulação linfocitária} = \frac{\text{nº de eventos (\%)} \times \text{contagem absoluta de linfócitos}}{100}$$

Sendo:

Número de eventos = contagens de células positivas para CD5⁺CD8⁺, CD5⁺CD4⁺ ou CD21⁺.

4.10. Proteínas séricas totais

As proteínas séricas totais foram determinadas pelo método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes¹ e leitura em espectrofotômetro semi-automático².

4.11. Fracionamento eletroforético

As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP. O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por LAEMMLI (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELECTROPHORESIS CELLS[®] - BIO-RAD).

A polimerização do gel foi possível pela adição de 15μL de tetrametiletilenodiamina (TEMED)³ e 0,3μL de persulfato de amônia a 10%.

¹ Labtest – Sistema de Diagnósticos Ltda – Belo Horizonte - MG

² Labquest – Sistema de Diagnósticos Ltda – Belo Horizonte - MG

³ Sigma, ST. Louis-MO, USA.

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que continha o gel entrou em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada etéril. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10µL de soro sanguíneo diluídos em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5µL das referidas amostras era depositada no fosso do gel.

A placa era colocada em suporte apropriado⁴, em contato com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel era corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem nítidas.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria computadorizada⁵ (SHIMADZU CS-9301) através do escaneamento das amostras. Para identificação das proteínas foram utilizados marcadores⁶ (SIGMA MARKER™, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD, além das proteínas purificadas albumina, alfa-1-antitripsina, haptaglobina, ceruloplasmina, transferrina e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

⁴ Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX-USA

⁵ Shimadzu, Shimadzu Corp., Kyoto-Japão

⁶ Sigma-Aldrich Biotechnology LP.

4.12. Análise estatística

Os dados obtidos para contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas; contagem diferencial de leucócitos; determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina; contagem de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos/supressores, assim como, para proteínas séricas e seu fracionamento eletroforético, foram tabulados e submetidos a Análise de Variância pelo teste F. O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação das médias entre as diferentes raças de cães. Com o objetivo de verificar a correlação entre as subpopulações linfocitárias e as proteínas séricas foi aplicado o Coeficiente de Correlação de Pearson, sendo o nível de significância estabelecido em 0,05. As análises foram realizadas no programa estatístico Statistical Analysis System (SAS User's Guide: Statistics, 1985).

5. RESULTADOS

Os valores médios obtidos para os diferentes parâmetros eritroleucométricos e citofluorométricos, dos quatro grupos estudados (Beagle – G1, Golden Retriever – G2, Bulldog Inglês - G3 e SRD – G4), estão apresentados nas Tabelas e Figuras 3 a 5.

5.1. Eritrograma

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), nos quatro grupos estudados, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 3. Verificou-se que a contagem global de hemácias, concentração de hemoglobina, o hematócrito e o VCM foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em G3, comparativamente àqueles valores observados em G1, G2 e G4. Quanto ao CHCM, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), entre as médias dos animais estudados. Com exceção do hematócrito dos Bulldogs Ingleses os valores observados estão dentro dos limites de normalidade citados para o cão (Apêndice 1).

Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

GRUPOS	CONT. GLOBAL DE HEMÁCIAS (X 10 ⁶ /μL)		CONC. DE HEMOGLOBINA (g/dL)		HEMATÓCRITO (%)		VCM (fL)		CHCM (g/dL)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
G1	7,03 B	0,92	14,17 B	2,06	49,79 B	6,84	70,6 B	1,71	28,42 A	1,05
G2	6,42 B	0,78	14,23 B	1,68	44,82 B	6,10	69,3 B	1,63	31,75 A	0,62
G3	8,02 A	0,44	16,94 A	0,96	59,88 A	3,43	74,6 A	2,45	28,26 A	0,42
G4	6,59 B	0,94	14,49 B	2,32	43,61 B	7,04	66,0 C	3,05	33,24 A	1,70

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

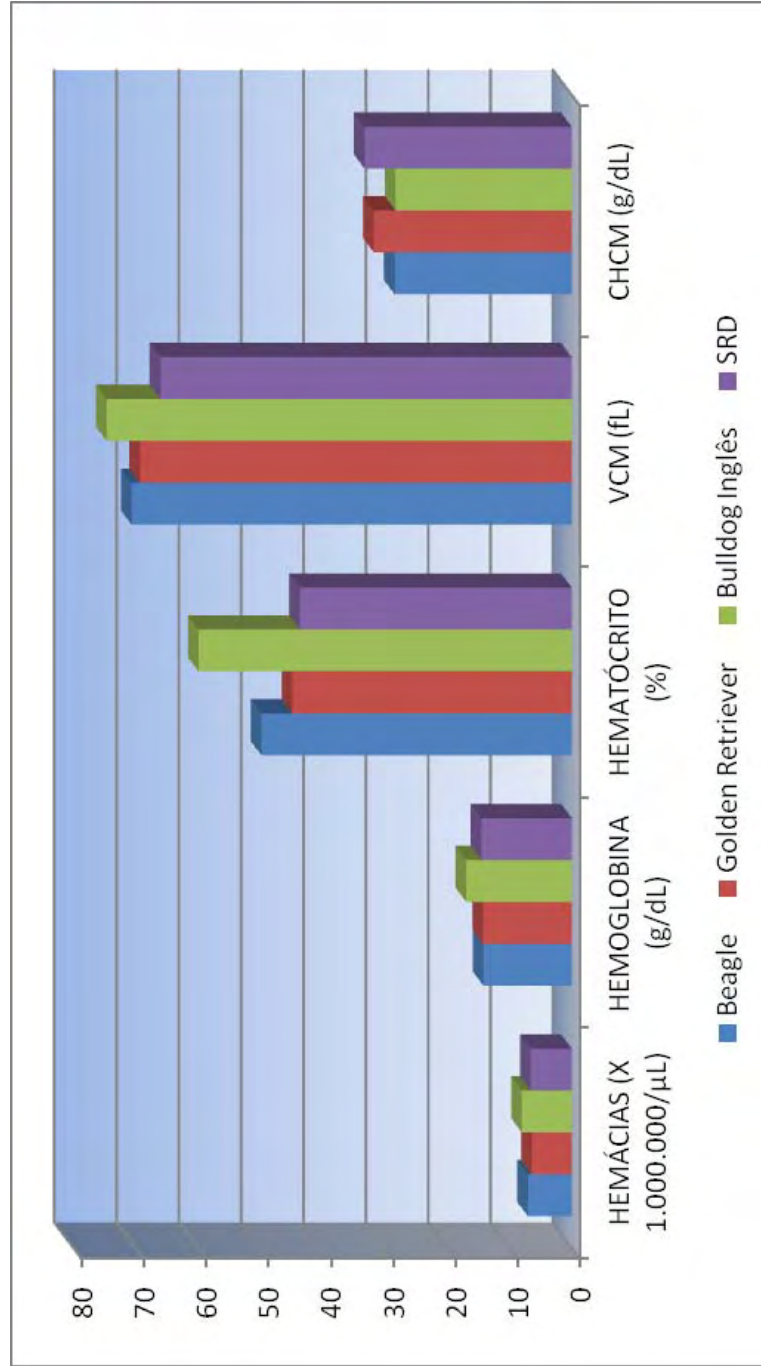


Figura 4. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

5.2. Leucograma

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens globais de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos nos quatro grupos estudados, estão apresentados na Tabela e Figura 4.

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens globais de basófilos nos grupos G1, G2, G3 e G4 foram de $0,02 \pm 0,05 \times 10^3$ células/ μL ; 0 células/ μL ; $0,01 \pm 0,04 \times 10^3$ células/ μL e $0,01 \pm 0,04 \times 10^3$ células/ μL , respectivamente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos analisados, para as contagens globais de basófilos.

Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para as contagens globais de eosinófilos foram de $0,38 \pm 0,15 \times 10^3$ células/ μL ; $0,42 \pm 0,21 \times 10^3$ células/ μL ; $0,19 \pm 0,21 \times 10^3$ células/ μL e $1,4 \pm 1,2 \times 10^3$ células/ μL , para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente. A média da contagem global de eosinófilos no grupo G4 foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a média dos grupos G1, G2 e G3.

Verificou-se que os valores médios obtidos para as contagens globais de linfócitos foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos grupos G3 e G4, comparativamente aqueles valores observados para as parcelas experimentais dos grupos G1 e G2.

Tabela 4. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

GRUPOS	LEUCÓCITOS (X 10 ³ /μL)		NEUTRÓFILOS BASTONETES (X 10 ³ /μL)		NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS (X 10 ³ /μL)		LINFÓCITOS (X 10 ³ /μL)		MONÓCITOS (X 10 ³ /μL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
G1	10,68 A	2,75	0,32 A	0,21	7,68 A	2,09	1,80 B	0,48	0,45 A	0,18
G2	10,79 A	1,58	0,28 A	0,14	7,8 A	1,28	1,95 B	0,49	0,37 A	0,11
G3	13,02 A	1,85	0,17 A	0,27	8,34 A	1,56	3,88 A	1,42	0,45 A	0,26
G4	13,02 A	4,4	0,12 A	0,08	7,2 A	3,33	3,81 A	1,94	0,42 A	0,26

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

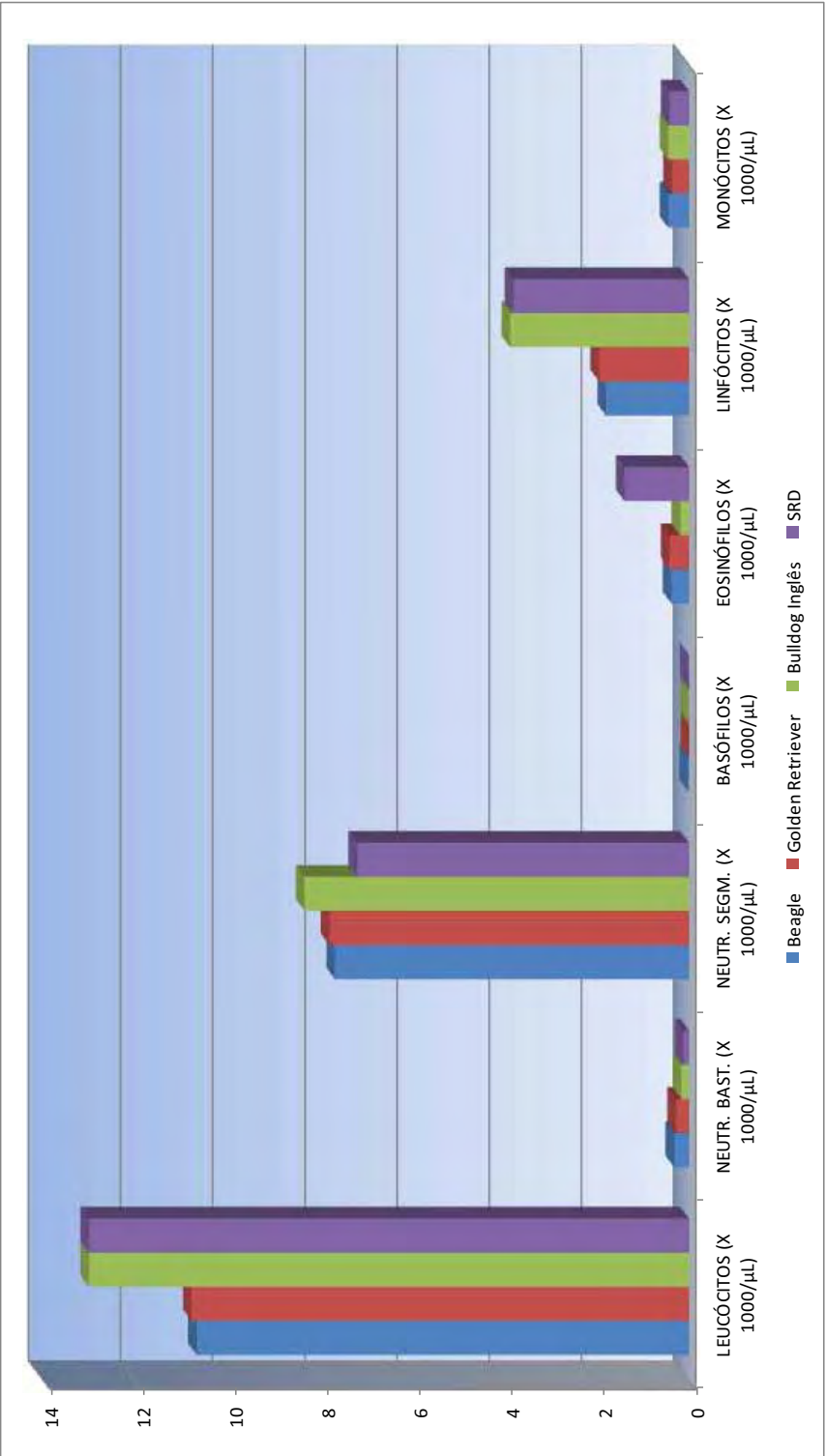


Figura 5. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens globais de leucócitos, contagens absolutas de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

5.3. Imunofenotipagem de linfócitos

Os valores e os desvios-padrão obtidos para as contagens de células $CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$, por intermédio da citometria de fluxo, nos quatro grupos de cães avaliados, estão apresentados na Tabela 5 e Figura 5. Observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos T citotóxicos foi significativamente maior ($p<0,05$) nos grupos G3 e G4, comparativamente aqueles encontrados nos grupos G1 e G2. Ademais, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos B foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo G3, quando comparado àquele do grupo G1.

Tabela 5. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens de células CD5⁺CD8⁺, CD5⁺CD4⁺ e CD21⁺, por meio da citometria de fluxo, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

GRUPOS	CD5 ⁺ CD8 ⁺ (células/ μ L)		CD5 ⁺ CD4 ⁺ (células/ μ L)		CD21 ⁺ (células/ μ L)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
G1	155,00 B	74,33	746,00 A	253,8	171,00 B	65,4
G2	206,00 B	103,58	642,00 A	150,63	299,00 AB	149,22
G3	544,00 A	184,84	1101,00 A	433,48	494,00 A	386,23
G4	503,00 A	311,29	855,00 A	559,46	403,00 AB	342,21

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

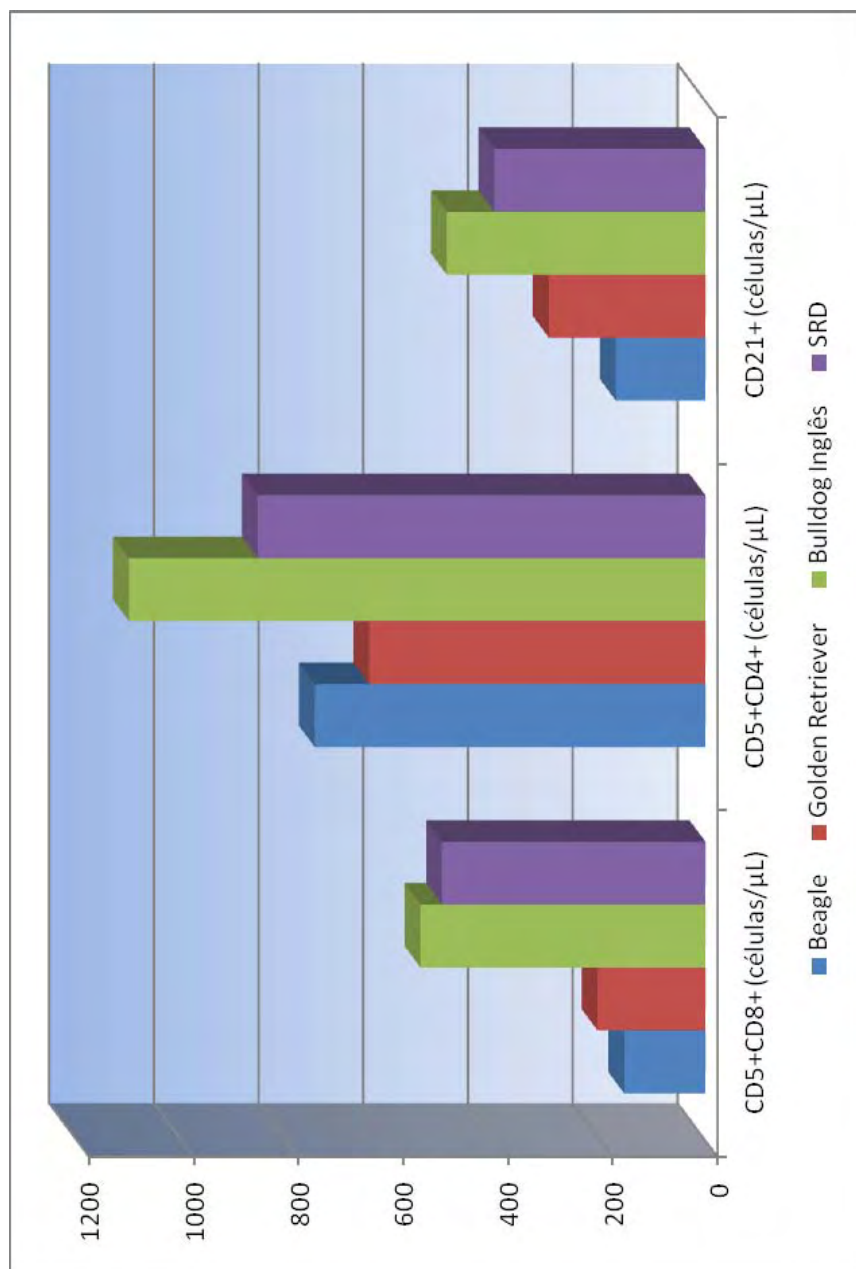


Figura 6. Representação gráfica dos valores médios obtidos para contagens de células $CD5^+CD8^+$, $CD5^+CD4^+$ e $CD21^+$, por meio da citometria de fluxo, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

5.4. Proteinograma sérico

O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A Figura 6 ilustra a separação em SDS-PAGE das proteínas séricas nos cães.

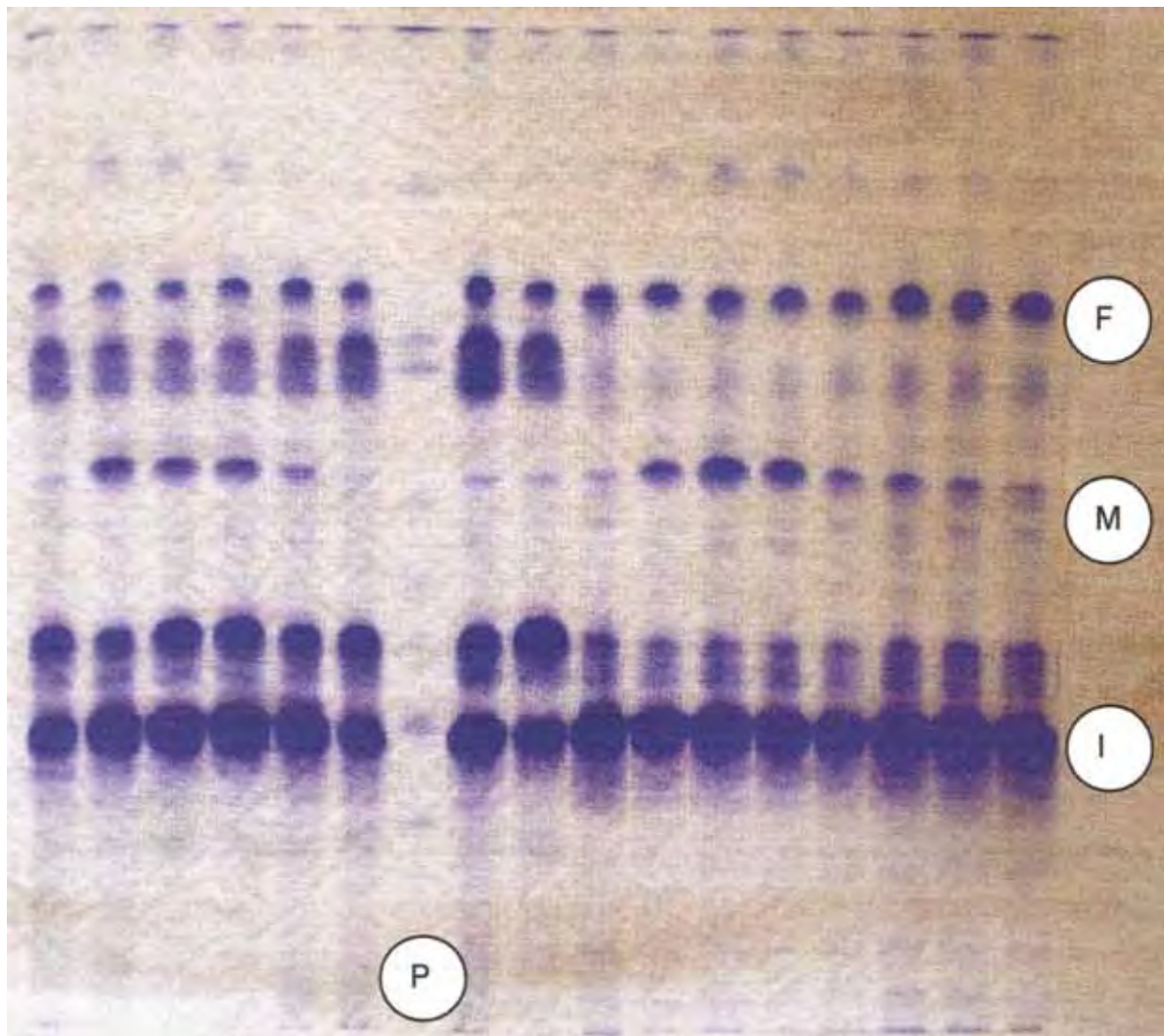


Figura 7. Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães. Há 17 amostras de soro sanguíneo, sendo a amostra padrão (P) o espaço 7. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), albumina (65 KD), alfa-1-antitripsina (60 KD) e IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37KD). Ao final (F) do gel está a IgG (cadeia leve) (25 KD).

A técnica de SDS-PAGE permitiu o fracionamento de 17 a 25 proteínas, dependendo da amostra utilizada, cujos pesos moleculares variaram de aproximadamente 18 a 245 kilodáltons (KD). Para os animais estudados neste ensaio 9 proteínas apresentaram importância na eletroforese, identificadas nominalmente (Tabela 6): albumina, 65 KD; alfa-1-antitripsina (AAT), 60 KD; alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), 37 KD; ceruloplasmina, 125 KD; haptoglobina, 39 KD; transferrina, 85 KD; imunoglobulina A (IgA), 170 KD; imunoglobulina G (IgG) (cadeia pesada), 52 KD e imunoglobulina G (IgG) (cadeia leve), 25 KD. Os valores das proteínas séricas totais está representado na Tabela 6.

A proteína total e as frações protéicas encontradas foram descritas na seguinte ordem: proteína total, albumina, alfa globulinas (AAT, AGP, ceruloplasmina e haptoglobina), beta globulina (transferrina) e gama globulinas (IgA, IgG de cadeia pesada e leve).

As médias das concentrações séricas das proteínas totais (g/dL), albumina (mg/dL) e imunoglobulina A (mg/dL) não apresentaram diferenças significativas entre as raças de cães. Verificou-se que a concentração sérica média de AAT (mg/dL) foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo G2 comparativamente aquelas dos grupos G1, G3 e G4. Contudo, para a AGP, a concentração sérica média (mg/dL) foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos grupos G1, G3 e G4, quando comparados aquela do G2. A concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo G1, relativamente às médias dos grupos G2 e G3. O grupo G4 também apresentou uma concentração sérica média de ceruloplasmina (mg/dL) significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo G2. Com relação à haptoglobina observou-se que a concentração sérica média dessa proteína (mg/dL) foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo G1, comparativamente aos grupos G2 e G4. A concentração sérica média de transferrina (mg/dL) foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos grupos G1, G2 e G4, quando comparados ao G3. Com relação à concentração sérica média de imunoglobulina G (mg/dL) foi observada uma quantidade significativamente maior ($p < 0,05$) da IgG (cadeia pesada) no G4, quando comparado ao

G1. Observou-se também uma concentração sérica média (mg/dL) significativamente maior ($p < 0,05$) de IgG (cadeia leve) no G2, comparativamente ao G1 (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para as concentrações séricas de proteína total (g/dL) e das frações proteicas (mg/dL), por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

GRUPOS	PROTEÍNA TOTAL		ALBUMINA		α1-ANTITRIPSINA		α1-GLIC. ÁCIDA		CERULOPLASMINA	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
G1	6,96 A	0,89	4329,08 A	595,9	327,93 B	69,57	14,5 A	6,69	20,22 A	16,1
G2	7,52 A	0,76	4454,31 A	324,4	411,42 A	70,37	4,01 B	2,41	3,75 C	2,74
G3	7,18 A	0,43	4302,22 A	239,23	317,83 B	40	10,24 A	3,78	8,68 BC	11,03
G4	7,3 A	1,32	4446,37 A	437,74	320,08 B	85,34	10,64 A	2,42	20,92 AB	22,07
	HAPTOGLOGINA		TRANSFERRINA		IMUNOGLOBULINA A		IMUNOGLOBULINA G (CP)		IMUNOGLOBULINA G (CL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
G1	24,2 A	5,87	138,47 A	47,4	22,12 A	9,38	759,72 B	188,39	360,91 B	105,46
G2	13,88 B	3,87	153,38 A	51,47	23,84 A	17,2	968,74 AB	171,62	877,7 A	443,08
G3	19,2 AB	6,69	77,92 B	37,12	21,33 A	12,08	941,18 AB	263,87	594,76 AB	220,66
G4	15,36 B	9,26	120,17 A	29,9	28,11 A	19,95	1084,3 A	371	710,76 AB	440,41

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

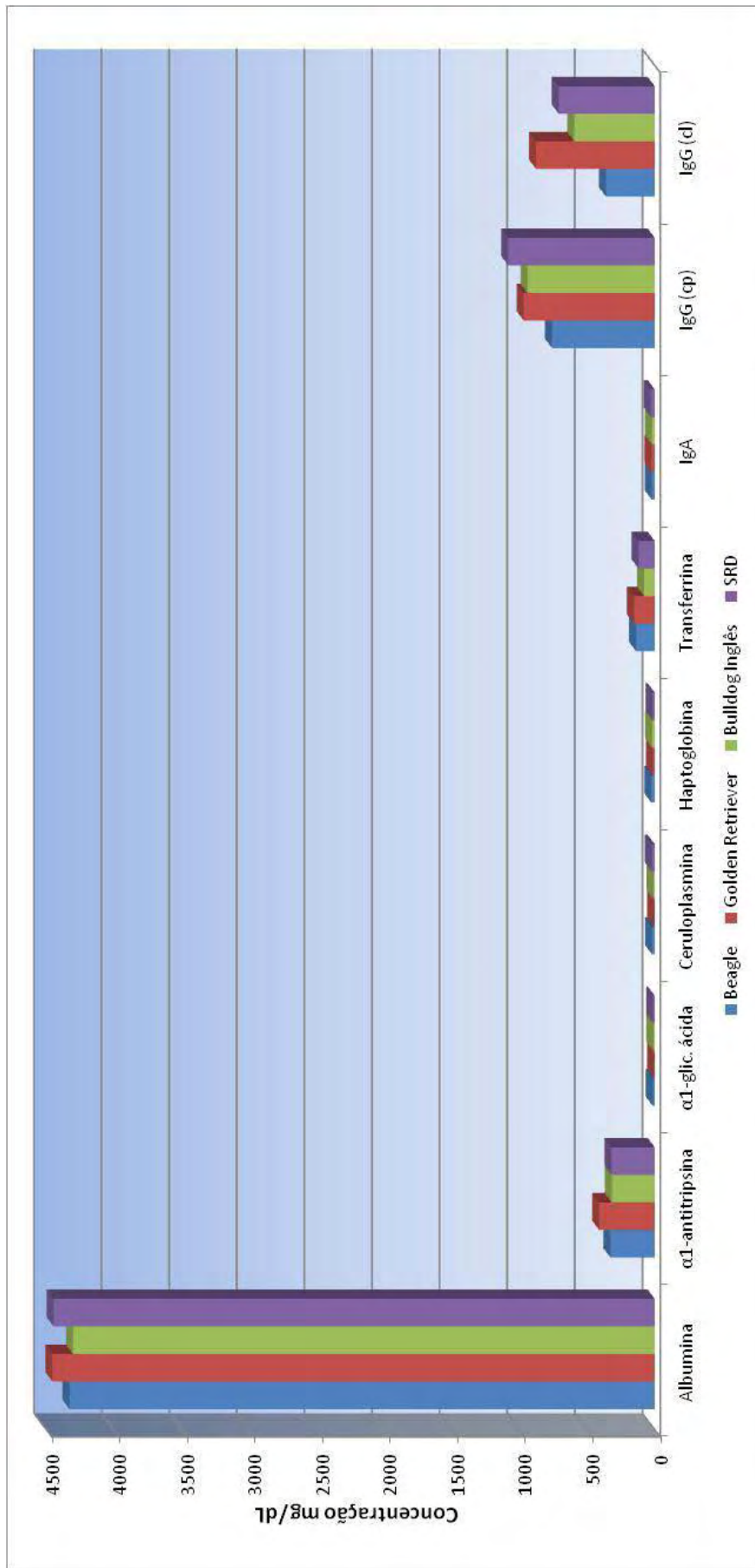


Figura 8. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) das frações protéicas, albumina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina, IgA, IgG (cadeia pesada) e IgG (cadeia leve), verificadas na SDS-PAGE, em cães Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e sem raça definida (SRD) (G4). Jaboticabal (SP), 2012.

5.5. Teste de correlação de Pearson (Subpopulações linfocitárias VS Variáveis seroprotéicas)

Os valores obtidos no teste de correlação de Pearson (r) para as contagens de células $CD5^+CD4^+$, $CD5^+CD8^+$ e $CD21^+$, quando confrontadas com as variáveis seroprotéicas dos cães estudados, estão apresentados na Tabela 7. A análise dos dados da pesquisa não indicou correlação significativa ($p>0,05$) entre as subpopulações linfocitárias e as frações protéicas analisadas.

Tabela 7. Subpopulações linfocitárias e suas correlações com as concentrações séricas das frações protéicas, albumina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina, IgA, IgG (cadeia pesada) e IgG (cadeia leve). Jaboticabal (SP), 2012.

Subpopulação	Proteína	r	p
CD5⁺CD8⁺	Albumina	- 0,079	0,629
	α1-antitripsina	0,111	0,497
	α1-glic. ácida	0,077	0,639
	Ceruloplasmina	0,051	0,757
	Haptoglobina	0,296	0,066
	Transferrina	0,238	0,142
	Imunoglobulina A	- 0,195	0,232
	Imunoglobulina G (CP)	- 0,226	0,165
	Imunoglobulina G (CL)	- 0,109	0,507
CD5⁺CD4⁺	Albumina	- 0,102	0,535
	α1-antitripsina	0,029	0,860
	α1-glic. ácida	0,127	0,437
	Ceruloplasmina	- 0,081	0,620
	Haptoglobina	0,165	0,312
	Transferrina	0,154	0,348
	Imunoglobulina A	- 0,124	0,449
	Imunoglobulina G (CP)	- 0,211	0,196
	Imunoglobulina G (CL)	0,038	0,813
CD21⁺	Albumina	- 0,222	0,173
	α1-antitripsina	0,087	0,596
	α1-glic. ácida	- 0,124	0,449
	Ceruloplasmina	- 0,006	0,966
	Haptoglobina	0,039	0,812
	Transferrina	- 0,046	0,776
	Imunoglobulina A	- 0,077	0,638
	Imunoglobulina G (CP)	- 0,273	0,091
	Imunoglobulina G (CL)	- 0,096	0,557

6. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o propósito de avaliar possíveis influências raciais sobre a função imunológica, variáveis hematológicas e eletroforéticas de cães saudáveis.

Os parâmetros eritroleucométricos e de bioquímica sérica permaneceram dentro dos intervalos de referência reportados, respectivamente, por FELDMAN et al. (2000) e KANEKO et al. (2008). Contudo, verificou-se que a contagem global de hemácias, concentração de hemoglobina, o hematócrito e o VCM foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos cães da raça Bulldog Inglês, comparativamente aqueles valores observados nos cães das raças Beagle, Golden Retriever e naqueles sem raça definida (SRD). O valor médio obtido para o hematócrito, no sangue periférico de cães das raça Bulldog Inglês ($59,88 \pm 3,43\%$), apresentou-se acima daquele considerado fisiológico para cães (FELDMAN et al., 2000).

A síndrome braquicefálica, também denominada síndrome das vias aéreas braquicefálicas e síndrome de obstrução das vias aéreas braquicefálicas, é caracterizada por apresentar uma ou mais anormalidades anatômicas congênitas das vias aéreas superiores. Os defeitos primários incluem estenose dos orifícios nasais, prolongamento do palato mole e hipoplasia traqueal, podendo provocar alterações secundárias como eversão dos sacúlos laríngeos e colapso laríngeo (WYKES, 1991; MONNET, 2003; VADILLO, 2007).

Comumente observada em cães de raças braquicefálicas, como Shih tzu, Lhasa Apso, Maltês, Boxer, Bulldog Inglês e francês, Cavalier King Charles Spaniel, Pequinês, Pug e Boston terrier e, em alguns gatos de face curta como o Persa e Himalaio, a síndrome é importante devido à gravidade dos sinais clínicos e em seu potencial risco de morte (WALKER, 2006; VADILLO, 2007).

O estreitamento das narinas e o prolongamento do palato mole são considerados alterações primárias nos cães braquicefálicos, e como tal podem ser diagnosticadas em animais jovens. A hipoplasia traqueal, ou afecção congênita, também pode ser

diagnosticada em animais jovens (HARVEY & FINK, 1982; ETTINGER & BRAYLEY, 1997); sua causa é desconhecida, porém, baseada no fato do Bulldog Inglês ser seu maior representante e não se ter relatos desta condição antes de 1972, tem-se abertura às especulações que possa ser devido a um componente hereditário (SUTER et al., 1972).

Segundo BUSH (2004) os valores de referência para hematócrito, hemoglobina e número de hemácias podem apresentar variações na dependência da localização geográfica e características raciais. Animais que vivem em altitudes superiores a 1.800m apresentam valores mais altos do que aqueles que vivem no nível do mar. De acordo com o mesmo autor, as raças braquicefálicas apresentam hematócrito superior ao de animais de raças normocefálicas.

A policitemia absoluta secundária ou eritrocitose é estimulada por um aumento da produção de eritropoietina e, por esta razão, a concentração de eritropoietina do plasma geralmente está aumentada (BUSH, 2004). A hipóxia, resultante de insuficiência respiratória crônica, é a causa mais comum de indução fisiológica de uma aceleração apropriada da produção de eritropoietina. O sangue de coloração escura e membranas mucosas cianóticas, em pacientes aparentemente saudáveis, são indicativos do distúrbio, tais achados corroboram aqueles encontrados em nosso estudo e podem estar relacionados com os maiores valores nos parâmetros eritrométricos encontrados nos Bulldogs Ingleses.

Em relação aos resultados obtidos para o leucograma, verificou-se que a média da contagem global de eosinófilos no grupo de cães SRD foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a média dos grupos de Beagles, Golden Retrievers e Bulldogs Ingleses. Tais resultados podem estar relacionados ao fato desses cães serem provenientes de um Centro de Controle de Zoonoses, portanto, eram cães errantes que, apesar de clinicamente saudáveis para a realização do experimento, não receberam durante determinado período de suas vidas os devidos cuidados higiênico-sanitários para o controle de endo e ectoparasitas. Além disso, a exposição crônica aos parasitas pode ter contribuído para a elevação dos eosinófilos circulantes.

Ainda em relação ao leucograma observou-se que os valores médios obtidos para as contagens globais de linfócitos foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos Bulldogs Ingleses e cães SRD, comparativamente aqueles valores observados para as parcelas experimentais dos Beagles e Golden Retrievers. No presente estudo, tais diferenças podem estar relacionadas à reação dos animais ao estresse agudo. Os cães Beagles e Golden Retrievers utilizados no ensaio estavam acostumados à constante manipulação, já que pertenciam a grupos de estudo para Nutrição e Síndrome da Distrofia Muscular de Duchenne, respectivamente. De acordo com KERR (2003) o estresse agudo, ocasionado por dor, medo e transporte, por exemplo, causa o aumento das catecolaminas. Após a secreção das catecolaminas ocorre uma redistribuição de linfócitos entre o sangue, vasos linfáticos e órgãos linfoides. A linfocitose pode ser causada pelo bloqueio mediado pela epinefrina na entrada dos linfócitos para os tecidos linfóides ou pela mobilização dos linfócitos do ducto torácico (FELDMAN et al., 2000). O efeito das catecolaminas é fugaz e dura em torno de 20 a 30 minutos (FELDMAN et al., 2000; NELSON & COUTO, 2003).

Como definido em 1993, no “First Canine Leukocyte Antigen Workshop”, para a identificação das células pant-T deve-se utilizar como marcador de superfície o CD5; para os linfócitos T auxiliares, o CD4; para os linfócitos T citotóxicos, o CD8; e, finalmente, para os linfócitos B, o CD21 (COBBOLD & METCALFE, 1994). Tais recomendações foram acatadas para a escolha dos anticorpos monoclonais utilizados neste experimento. O protocolo de dupla marcação e os fluorocromos utilizados no presente ensaio mostraram-se eficientes para que houvesse uma seleção específica das diferentes subpopulações linfocitárias analisadas.

A preparação das amostras para posterior análise no citômetro de fluxo foi feita através da lise do sangue total. Esse é o método de escolha, particularmente em medicina de pequenos animais, onde a quantidade de sangue disponível para análise é limitado ao tamanho do animal e seu estado de saúde. A lise do sangue total também é o método mais utilizado em laboratórios médicos humanos, já que reduz o tempo de

manipulação das amostras e, portanto, a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas ao corpo funcional do Laboratório (FALDYNA et al., 2000).

No presente estudo, as amostras de sangue foram processadas para análise citofluorométrica em até duas horas após a colheita. FALDYNA et al. (2000) avaliaram a influência do tempo de armazenamento na distribuição das subpopulações linfocitárias e não encontraram efeitos significativos quando as amostras foram armazenadas a 4°C por 12 a 16 horas antes do processamento. Resultados similares foram obtidos por SHIELD et al. (1983), NICHOLSON et al. (1984) e PONZIO et al. (1984). Por outro lado, muitos autores relataram mudanças resultantes do armazenamento das amostras de sangue (WEIBLEN et al., 1984; EKONG et al., 1993). Muitas dessas mudanças podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela contaminação do “gate” de linfócitos por neutrófilos (VAN LAMBALGEN & VAN MEURS, 1985). LOYD et al. (1995) não detectaram mudanças em amostras de sangue ovino armazenado em temperatura ambiente por 48 horas.

Neste ensaio, foram utilizados cães adultos com idades que variavam de 2 a 7 anos. Tal separação por idade é de extrema importância em estudos que visam avaliar a distribuição de subpopulações linfocitárias nas várias espécies animais. BORTNIK et al. (1999) investigaram mudanças pós-natais na distribuição de subpopulações linfocitárias no sangue periférico, timo e linfonodo poplíteo de gatos e concluíram que a quantidade de linfócitos T CD8⁺ tende a aumentar com a idade. FALDYNA et al. (2001) asseveraram que a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico de cães neonatos é alta e tende a diminuir com a idade. Os mesmos autores não encontraram relação entre a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ com a idade de cães.

Em nosso estudo, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos T citotóxicos foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos Bulldogs Ingleses e em cães SRD, comparativamente aqueles encontrados nos Beagles e Goldens Retrievers. Ademais, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos B foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos Bulldogs, quando comparado àquele dos Beagles. A Federação Cinológica

Internacional reconhece 330 raças de cães e muitas delas apresentam uma predisposição racial ou uma maior prevalência de doenças nas quais o sistema imune está envolvido (DAY, 1999). É possível que existam diferenças entre as raças na atividade do sistema imune.

CHABANNE et al. (1995) e DENEROLLE (1998) ressaltam que a piodermite em Pastores Alemães pode levar a uma redistribuição das subpopulações linfocitárias nesses animais. Os citados autores asseveram que a baixa contagem combinada com a reduzida atividade de linfócitos circulantes, nesses cães, pode levar à maior susceptibilidade dos mesmos à enfermidade.

Muitos cães braquicefálicos são afetados por vários tipos de obstrução, no entanto, os sinais clínicos dependem da intensidade da oclusão do fluxo aéreo nas vias aéreas superiores, podendo variar de suaves a severos, incluindo respiração ruidosa, estridores e estertores, tosse, alteração vocal, tentativas de vômito, engasgos, espirros reversos, intolerância ao exercício, dispnéia, mucosas pálidas ou cianóticas, agonia respiratória e síncope. Esses animais, em sua maioria, não conseguem regular sua temperatura corporal podendo haver hipertermia, e cuja sintomatologia pode se agravar em temperaturas ambientais elevadas (VADILLO, 2007).

Diante das considerações pode-se inferir que a maior susceptibilidade dos Bulldogs Ingleses, assim como a maior exposição dos cães SRD, aos antígenos presentes no meio ambiente, contribuiu para as diferenças observadas entre as subpopulações linfocitárias dos cães presentes no ensaio.

Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas), obtidas por eletroforese, representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico (KANEKO et al., 1997). Além disso, o proteinograma sérico em SDS-PAGE, representa um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação de proteínas dos fluidos corporais (KANEKO et al., 2008).

Neste estudo, foram encontradas de 17 a 25 frações protéicas, porém somente nove apresentaram evidência no traçado eletroforético. As proteínas séricas totais

incluem albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas. As subfrações de alfa globulinas encontradas neste ensaio incluíram alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), alfa-2-ceruloplasmina e alfa-2-haptoglobina. A transferrina foi a beta globulina encontrada. A IgA foi encontrada e há controvérsias na sua localização na curva eletroforética. Segundo BUSH (2004), a IgA localiza-se na fração beta globulina, já NAOUM (1999), relata entre alfa-2-globulina e gama globulina. As gama globulinas detectadas incluíram IgG de cadeia pesada e leve.

Cães da raça Golden Retriever apresentaram concentrações significativamente maiores ($p < 0,05$) de alfa-1-antitripsina, se comparados aos cães das demais raças estudadas. Segundo MURATA et al. (2004), valores mais baixos de AAT estão relacionados à menor intensidade de inflamação. Entretanto, os Golden Retrievers, apresentaram concentrações significativamente menores ($p < 0,05$) de alfa-1-glicoproteína ácida e ceruloplasmina, quando comparados com as demais raças do estudo. A AGP apresenta propriedades imunomoduladoras, de reparo e de cicatrização, se liga à maioria das drogas e agentes inespecíficos, apresentando sua concentração elevada na babesiose, erliquiose, parvovirose e neoplasias como linfoma, sarcoma e carcinoma (CERÓN et al., 2005). Em cadelas com piometra, as quantidades de alfa-1-glicoproteína ácida variam de acordo com o aumento da severidade do problema e com o tempo de internação (HAGMAN, 2011). CERÓN et al. (2005) asseveram que a alfa-1-glicoproteína ácida ainda possui diversas funções como agente antiinflamatório e imunomodulador, aumentando a secreção da IL-1. Já a ceruloplasmina é uma glicoproteína, descrita como proteína de fase aguda (PFA) transportadora de cobre, essencial para a eritropoiese, com efeito antioxidante nas células e tecidos, a fim de protegê-los de compostos gerados pela fagocitose de microorganismos e debris de tecidos e redução de neutrófilos anexados ao endotélio (GRUYS et al., 1994; CERÓN et al., 2005).

Em relação à haptoglobina, observou-se concentrações séricas significativamente maiores ($p < 0,05$) dessa proteína nos Beagles e Bulldogs Ingleses, comparativamente aos Golden Retrievers e cães SRD. A haptoglobina é considerada

uma das principais proteínas de fase aguda para todas as espécies, principalmente para bovinos, nos quais constitui a principal proteína de fase aguda. A elevação de seus valores em cães é ocasionada por processos inflamatórios, corticoterapia (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002), tripanossomíases, leishmaniose, trauma e síndrome de Cushing (CÉRON et al., 2005).

A transferrina apresentou concentrações séricas significativamente menores ($p < 0,05$) nos Bulldogs Ingleses, quando comparados com as outras raças presentes no estudo e com os cães SRD. Segundo THOMAS (2000), a transferrina tem a função de se ligar ao ferro para transportá-lo aos tecidos, e concentrações elevadas podem estar relacionadas com deficiência de ferro. Além disso, a concentração sérica de transferrina pode aumentar na doença hepática e síndrome nefrótica e diminuir na doença de armazenamento de ferro (ECKERSALL, 2008). Quando os níveis de ferro sérico estão elevados, como nas anemias hemolíticas, os animais devem se tornar mais suscetíveis à infecção bacteriana, pois muitas bactérias necessitam do ferro para crescimento (TIZARD, 2008).

Nos resultados encontrados no ensaio em tela, verificou-se que as concentrações séricas médias de IgA não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as raças presentes no estudo. PETERS et al. (2004) mediram as concentrações fecais de IgA, IgG e IgM em quatro diferentes raças de cães, e observaram que as concentrações fecais médias de IgA foram significativamente maiores em Schnauzers miniatura, quando comparados com Pastores Alemães ($p = 0,0003$) e Labradores ($p = 0,0004$), porém não diferiram significativamente de Beagles. A IgA compõe secreções externas (JAIN, 1993), porém neste ensaio, sua mensuração foi conduzida no soro sanguíneo, o que pode ter contribuído para os achados deste estudo.

As concentrações séricas médias de IgG (cadeia pesada) foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos cães SRD, comparativamente aos Beagles. Já as concentrações séricas médias de IgG (cadeia leve) foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos Golden Retrievers, quando estes são comparados aos Beagles. Os

resultados discordam daqueles relatados por PETERS et al. (2004) que não encontraram diferenças significativas nas concentrações fecais de IgG entre Beagles, Pastores Alemães, Schnauzers miniatura e Labradores. Mais uma vez o tipo de material biológico utilizado para dosagem, assim como as raças envolvidas no estudo podem ter contribuído para as diferenças nos resultados.

Apesar dos conhecimentos sobre a importância das subpopulações linfocitárias e a interação destas com as proteínas plasmáticas, em especial as proteínas de fase aguda, na cascata imuno-inflamatória (GALLEY & WEBSTER, 1996), não existem estudos que relacionem qualiquantitativamente as subpopulações linfocitárias com as proteínas plasmáticas em cães saudáveis. No presente estudo, não foi possível estabelecer uma correlação entre a quantidade de linfócitos T $CD5^+CD8^+$, $CD5^+CD4^+$ e linfócitos B com as proteínas séricas analisadas. Possivelmente tal correlação seja mais aparente em animais que estejam com alguma enfermidade em curso.

7. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, bem como as condições de desenvolvimento de suas etapas experimentais, concluiu-se que:

1. Cães sem raça definida e Bulldogs Ingleses apresentam maiores contagens de linfócitos T $CD5^+CD8^+$ (citotóxicos) quando comparados com Beagles e Golden Retrievers;
2. Bulldogs Ingleses apresentam maiores contagens de linfócitos B quando comparados com Beagles;
3. Não foi possível estabelecer, em cães hípidos, correlação entre as subpopulações linfocitárias analisadas com as proteínas totais e suas frações.

8. REFERÊNCIAS⁷

BORTNIK, S. J.; ORANDLE, M. S.; PAPADI, G. P.; JOHNSON, C. M. Lymphocyte subsets in neonatal and juvenile cats: comparison of blood and lymphoid tissues. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 49, n. 4, p. 395-400, 1999.

BOWMAN, B. H. **Hepatic plasma proteins**. San Diego: Academic Press, 1992, p. 141-212.

BROWN, D. C.; GARTTEER, K. C. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. **Histopathology**, Murcia, n. 22, n. 5, p. 411-422, 1993.

BUSH, B. M. Bioquímica Plasmática. In: **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004, cap. 5, p. 169-223.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. 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. 73, n. 2, p. 167–182, 2000.

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

⁷ Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023:2002

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase protein in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CHABANNE, L.; COBBOLD, S. Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). **Veterinary immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 189 – 198, 1995.

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

COLETA, F. E. D. **Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma**. 2009. 97 p. (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; WISEMAN, A.; BAIN, R. K.; DOUGLAS, T. A. The acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica* and *Ostertagia ostertagii* and endotoxin administration. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 203-207, 1989.

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

DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU, G.; MAGNOL, J. P.; ULPAT, C.; CHABANNE, L. German Shepherd dog pyoderma: a prospective study of 23 cases. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 243-248, 1998.

DIAS, M. A. **Hemograma, citofluorometria de subpopulações linfocitárias e histologia de baço e linfonodos de cães hípidos tratados com doxorubicina**. 2003. 85 p. (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DIRSCHERL, P.; BEISKER, W.; KREMMER, E.; MIHALKOV, A.; VOSS, C.; ZIESENIS, A. Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. **Veternary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-2, p. 1–10, 1995.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155.

EKONG, T.; HILL, A. M.; GOMPELS, M.; BROWN, A.; PINCHING, A. J. The effect of the temperature and duration of sample storage on the measurement of lymphocyte subpopulations from HIV-1-positive and control subjects. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 151, n. 1-2, p. 217-225, 1993.

ETTINGER, S. J.; BRAYLEY, K. A. Afecções da traquéia. In: ETTINGER, S. J. FEELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Moléstias do cão e do gato**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 1064-1079.

EVANS, T. W. Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 6-11, 2002.

FAGLIARI, J. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A.; WEISS, D. J. Changes in plasma protein concentration in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 59, n. 10, p. 1234-1237, 1998.

FAGLIARI, J. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A.; WEISS, D. J. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 4, p. 383-387, 2003.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-567, 2002.

FALDYNA, M.; LEVA, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FALDYNA, M.; TOMAN, M. The effect of age on the distribution of lymphocyte and neutrophil granulocyte subsets in the peripheral blood of dog. **Veterinární Medicína Czech**, Prague, v. 43, n. 6, p. 193–199, 1998.

FELDMAN, B. F.; ZINNKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia, Lippincot Williams and Wilkins, 2000. 1376 p.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. The immuno-inflammatory cascade. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 11-16, 1996.

GERSHWIN, L. J. Clinical Veterinary Immunology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 6 ed. Burlington: Academic Press, 2008, p. 157-172.

GERSHWIN, L. J.; KRAKOWKA, S.; OLSEN, R. G. **Immunology and immunopathology of domestic animals**. 2 ed., 1995. p. 195.

GODOY, R. F.; SANTANA, A. E.; PALMA, P. B.; ROSSETTO, F.; OLIVEIRA, J. V. Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue do cordão umbilical de equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 734-739, 2007.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels**. New York: Elsevier, 1995. 213 p.

GORMAN, N. T.; HALLIWELL, R. E. W. The immunoglobulins: structure, genetics and function. In: HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary clinical immunology**. London: Saunders, 1989, p. 19-54.

GREELEY, E. H.; KEALY, R. D.; BALLAM, J. M.; LAWLER, D. F.; SEGRE, M. The influence of age on the canine immune system. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 55, n. 1-3, p. 1-10, 1996.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, Famham Royal, v. 64, n. 11, p. 1009-1018, 1994.

ISRAILI, Z. H.; DAYTON, P. G. Human alpha-1-glicoprotein and its interactions with drugs. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 33, n. 2, p. 161-235, 2001.

HAGMAN, R. Serum α -1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 40, n. 1, p. 52-59, 2011.

HARVEY, C. E.; FINK, E. Tracheal diameter: analysis of radiographic measurements in brachycephalic and non brachycephalic dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 18, n. 4, p. 570-576, 1982

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Lea & Febiger; Philadelphia. 1993. 417 p.

JONES, R. D.; OFFUTT, D. M.; LONGMOOR, B. A. Capture ELISA and flow cytometry methods for toxicologic assessment following immunization and cyclophosphamide challenges in beagles. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 33–44, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro. 1999. 427 p.

KANEKO, J. J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 117-138.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. Burlington: Academic Press, 2008. P. 117-155, 157-172.

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 of Clinical Pathologists, 1994, p. 1.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**. 2ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 61-80.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAYNER, L. L. Flow cytometry reveals the complexity and diversity of the immune system. In: **Clinical flow cytometry – principles and application**. Baltimore: Library of congress, 2002, cap. 4, p. 63-70.

LLOYD, J. B.; GILL, H. S.; HUSBAND, A. J. The effect of storage on immunophenotyping of sheep peripheral blood lymphocytes by flow cytometry. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 135-142, 1995.

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

MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CERÓN, J. J. Serum concentrations of acute phase protein in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 8, p. 241-244, 2002.

MIOTTO, M. R. **Expressão de CD45⁺ na medula óssea e sangue periférico de cães com linfoma tratados com alta dose de ciclofosfamida suportada por transplante autólogo de medula óssea**. 2009. 69 p. (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

MONNET E. Brachycephalic airway syndrome. In: SLATTER, D. **Textboof of Small Animal Surgery**. 2ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003, p. 808-813.

MOORE, P. F.; ROSSITTO, P. V.; DANILENKO, D. M.; WIELENGA, J. J.; RAFF, R. F.; SEVERNS E. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocytesubsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 75-85, 1992.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004

NAOUM, P. C.; CERON, C. R.; DOMINGOS, C. R. B. Conhecimentos Básicos de Eletroforese. In: NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos**. 2 ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 1999, p. 1-38.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Flow cytometry methodology and application in the veterinary hematology. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

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

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; GODOY, A. V. Quantificação de células CD34⁺ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 434-441, 2009.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3ed. Rio de Janeiro: Rocca, 2003, p. 486-488.

NICHOLSON, J. K.; JONES, B. M.; CROSS, G. D.; MCDOUGAL, J. S. Comparison of T and B cell analysis on fresh and aged blood. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 29-40, 1984.

PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H. **Handbook of vertebrate immunology**. American Press: London. 1998. 673 p.

PAXTON, H.; KIDD, P.; LANDAY, A.; GIORGI, J.; FLOMENBERG, N.; WALKER, E.; VALENTINE, F.; FAHEY, J.; GELMAN R. 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.

PETERS, I. R.; CALVERT, E. L.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 5, p. 841-848, 2004.

PONZIO, A. D.; SELF, S. E.; RONEY, D. H.; BURDASH, N. M.; LA VIA, M. F. Are lymphocyte subset determinations affected by storage conditions? **Diagnostic Immunology**, New York, v. 2, n. 3, p. 188-190, 1984.

PRINSEN, B. H. C. M.; SAIN-VAN der VELDEN., M. Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal disease. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 347, p. 1-14, 2004.

RIDINGS, J.; WEEDON, H.; IOANNOU, C.; FLEGO, L.; MACARDLE, P. J.; ZOLA, H. Purification of cord blood lymphocytes. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 195, n. 1-2, p. 43-48, 1996.

RIVAS, A. L.; LETWIN, B.; GREENLEE, P.; LÓPEZ, J.; FADDEN, M.; QUIMBY, F. Characterization of monoclonal antibodies directed to canine T lymphocyte markers expressed during development. **Veterinary immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p 1-11, 1996.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 2 ed. 1998. 480 p.

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

SANTANA, A. E. **Benzenismo Experimental: desenvolvimento da medula óssea ectópica**. 1988. 85 f. (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1988.

SAS Institute User's Guide: Statistics. Version 5 ed. Cary, 1985. 956p.

SHIELD, C. F.; MARLETT, P.; SMITH, A.; GUNTER, L; GOLDSTEIN, G. Stability of humam lymphocyte differentiation antigens when stored at room temperature. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 347-352, 1983.

STETLER-STEVENSON, M.; BRAYLAN, R. Flow cytometry analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 111-123, 2001.

SUTER, P. F.; COLGROVE, D. J.; EWING, G. O. Congenital hypoplasia of the canine trachea. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 8, p. 120-127, 1972.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 891-898.

TIPOLD, A.; MOORE, P.; JUNGI, T. W.; SAGER, H.; VANDEVELDE, M. Lymphocyte subsets and CD45RA positive T-cells in normal canine cerebrospinal fluid. **Journal of Neuroimmunology**, Baltimore, v. 82, n. 1, p. 90–95, 1998.

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

TIZARD, I. R. Veterinary **Immunology: An introduction**. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 147

TRUMEL, C.; SCHELCHER, F.; BRAUN, J. P.; GUELF, J. F. Serum protein electrophoresis: guidelines for diagnosis evaluation in the dog, cat and horse. **Revue Medicine Veterinaire**, Toulouse, v. 147, n. 2, p. 123-130, 1996.

VADILLO, A. C. Síndrome braquicefálica e paralisia laríngea em cães. In: ALONSO, J. A. M. **Enfermidades respiratórias em pequenos animais**. São Caetano do Sul, São Paulo: Interbook, 2007, p. 93-98.

VAN EWIJK, W. T cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. **Annual review of Immunology**, Palo Alto, v. 9, p. 591-615, 1991.

VAN LAMBALGEN, R.; VAN MEURS, G. J. Lymphocytes subpopulations do not alter during blood storage at 4 degrees C. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 39-43, 1985.

VERNAU, W. **Flow cytometry assessment of hematopoietic neoplasia in the dog.** 55th Annual Meeting of the American college of veterinary pathologist & 30th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology, 2004.

WALKER, T. The importance of breathing...brachycephalic airway syndrome. **Animal critical care and emergency services**, p. 1-2, Spring, 2006.

WATSON, A. D. J. Erythrocytosis and Polycythemia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary hematology**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 200-204.

WEIBLEN, B. J.; DEBELL, K.; GIORGIO, A.; VALERY, C. R. Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 179-183, 1984.

WYKES, P. M. Brachicephalic airway obstructive syndrome. **Problems in veterinary medicine**, Colorado, v. 3, n. 2, p. 188-197, 1991.

YAN, T. J.; GAWLAK, S. L. Lymphoid organ weights and organ: body weight ratios of growing beagles. **Laboratory Animals**, London, v. 23, n. 2, p. 143-146, 1989.

YANG, F. M.; HAILE, D. J.; BERGER, F. G.; HERBERT, D. C.; Van BEVEREN, E.; GHIO, A. J. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. **American Journal of Physiology-Lung Cell Molecular Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 2, p. L402-L409, 2003.

APÊNDICE

Apêndice A – Valores de referência para os parâmetros hematológicos, em cães saudáveis, segundo FELDMAN et al. (2000).

Parâmetros Hematológicos	Valores de referência
→ Parâmetros Eritrocitários	
- Contagem global de hemácias	5,5 a 8,5 x 10 ⁶ /μL
- Volume globular	37 a 55%
- Teor de hemoglobina	12 a 18 g/dL
→ Parâmetros Leucocitários	
- Contagem global de leucócitos	6,0 a 17,0 x 10 ³ /μL
- Fórmula leucocitária absoluta	
Neutrófilos segmentados	3,0 a 11,5 x 10 ³ /μL
Neutrófilos bastonetes	0 a 0,3 x 10 ³ /μL
Linfócitos	1,0 a 4,8 x 10 ³ /μL
Monócitos	0,15 a 1,35 x 10 ³ /μL
Eosinófilos	0,10 a 1,25 x 10 ³ /μL
Basófilos	raros