PERFIL IMUNOLÓGICO DE BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO COMPARADO A OUTRAS RAÇAS: FAGOCITOSE

SILVA, Adriana Reis Bittencourt¹; **JULIANO**, Raquel Soares²; **MUNIZ-JUNQUEIRA**, Maria Imaculada³; **SOUZA**, Saura Nayane⁴; **OLIVEIRA**, Helton Freires⁵; **COUTO**, Shirley Claudino Pereira⁶; **FIORAVANTI**, Maria Clorinda Soares⁷

Palavras-chave: Fagócitos, imunidade celular, leucócitos, raças naturalizadas.

1. INTRODUÇÃO

Trabalhos desenvolvidos em uma parceria entre órgãos governamentais, associações de criadores e empresas particulares, tentam livrar da ameaça de extinção a raça bovina Curraleiro, também conhecida como Pé duro. Esse gado pode ser considerado um verdadeiro tesouro genético, já que traz características de adaptação e resistência às condições brasileiras. O objetivo geral deste estudo foi realizar a avaliação funcional *in vitro* das etapas de aderência e fagocitose, em vacas de raças naturalizadas e mestiças, criadas sob as mesmas condições, verificando possíveis diferenças entre os grupos estudados, utilizando uma técnica laboratorial padronizada para seres humanos.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foi colhido sangue de 10 vacas Curraleiras, duas Mocho Nacional, três Crioulo Lageano e uma Junqueira. Esses animais compuseram o grupo denominado G1. O grupo G2 foi constituído de 15 vacas mestiças (^{3/4} Nelore x Simental), totalizando 31 animais. Todas as fêmeas estavam submetidas a manejo e condições ambientais semelhantes. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, em tubos a vácuo heparinizados e em tubos com EDTA.

2.2 Técnica de aderência

Distribuiu-se 40µl da amostra de sangue em cada área de 7mm de diâmetro delimitada com epóxi em lâminas de microscopia, com 8 escavações em cada lâmina, incubou-se em câmara úmida a 37°C por 45 minutos, lavou-se com PBS, pH 7,2 a 37°C, fixou-se com metanol e corou-se com Giemsa a 10%.

2.3 Teste de fagocitose

Para o teste de fagocitose foram realizados os procedimentos iniciais da etapa de aderência, até a lavagem com PBS (pH 7,2). Em seguida, 20µl de suspensão de leveduras sensibilizadas (S) e não sensibilizadas (NS) foram pipetadas em duplicata sobre as escavações contendo os fagócitos aderidos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, foram lavadas com PBS (pH 7,2) e pingou-se uma gota solução Hanks-triz com 30% de SFB. As lâminas foram secas com ar quente, fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa a 10%. Foram observadas ao microscópio óptico, com objetiva de 100x contando 100 neutrófilos, 100 monócitos, e 100 eosinófilos para determinar o índice fagocitário (média de leveduras fagocitadas por células envolvidas na fagocitose).

2.4 Hemograma

A contagem das células sanguíneas foi determinada pelo método automático utilizando-se o aparelho ABCvet (Animal Blood Counte – Horiba ABX – São Paulo), adaptado com o cartão próprio de leitura para a espécie bovina.

3. Resultados e discussão

3.1 Hemograma

Os resultados das médias do hemograma estão mostrados na Tabela 1; os valores encontrados para o G1 estão dentro dos limites descritos para animais da raça Curraleiro. O G2 apresentou valores de bastonetes e eosinófilos acima dos limites normais, além de apresentar linfócitos atípicos na contagem diferencial de leucócitos. Em bovinos essa situação está associada a condições agudas de estresse, pode manter-se por 6 a 24 horas. O aumento de eosinófilos em bovinos pode estar relacionado à liberação de catecolaminas em situações de manipulação, contenção e colheita de sangue.

TABELA 1 - Valores médios dos componentes do hemograma em vacas de raças naturalizadas (G1) e mestiças $\frac{3}{4}$ Nelore X Simental (G2)

Variável do hemograma	Naturalizadas G1	$\frac{3}{4}$ Nelore X Simental G2
Hemácias $\times 10^6/\mu\text{l}$	7,70	9,01
Hemoglobina g/dl	11,68	12,97
VG %	39,21	43,15
Leucócitos totais $\times 10^3/\mu\text{l}$	10,69	11,51
Bastonetes $/\mu\text{l}$	160,88	253,93
Segmentados $/\mu\text{l}$	2783,19	2900,20
Eosinófilos $/\mu\text{l}$	1232,94	1829,73
Linfócitos $/\mu\text{l}$	6127,56	5962,80
Linfócitos atípicos $/\mu\text{l}$	0,00	113,00
Monócitos $/\mu\text{l}$	394,31	510,47
Basófilos $/\mu\text{l}$	0,00	0,00

3.2 Aderência

Na Tabela 2 estão descritos os valores encontrados no teste de aderência dos fagócitos. O neutrófilo foi o tipo de fagócito que teve maior média de células aderidas nas lâminas, em ambos os grupos avaliados; porém, no G1 a aderência de neutrófilos foi significativamente maior que no G2 ($p < 0,05$). Não houve relação entre número e tipo de leucócitos encontrados no hemograma, na prova de aderência e de fagocitose. Esse resultado é esperado, já que o leucograma é um método de avaliação quantitativa e as demais provas são métodos de avaliação funcional dessas células.

TABELA 2 - Número total e diferencial de fagócitos resultantes do teste de aderência em vacas de raças nativas e mestiças $\frac{3}{4}$ Nelore X Simental

Fagócito	Naturalizadas G1	$\frac{3}{4}$ Nelore X Simental G2
Nº de células aderidas	1916,5	865,3
Nº de neutrófilos	1455,2	571,1
Nº de monócitos	120,4	108,6
Nº de eosinófilos	329,1	190,1

3.3 Resultado teste fagocitose

Os resultados obtidos no teste de fagocitose foram apresentados na Tabela 3. As médias dos índices fagocitários (IF) foram maiores quando as células estiveram incubadas com leveduras S, nas duas proporções de leveduras (1/45 e 1/180), para ambos os grupos, sugerindo que a fagocitose ativada por receptor Fc (FcR) de imunoglobulina e receptores para complemento (CR) é bastante importante nesses animais. Animais do G2 apresentaram valores médios de IF maiores que do G1, porém não houve diferença estatística entre os grupos, exceto quando submetidos ao desafio com leveduras 1/45 NS. O G1 apresentou IF significativamente maior ($p < 0,05$) quando submetido ao desafio com leveduras 1/45NS e este resultado pode indicar que a fagocitose ativada por receptores de colectinas é uma via importante

para esses animais. As colectinas são proteínas oligoméricas que possuem uma ligação cálcio dependente com as lecitinas; entre elas estão: a proteína ligante da manose (MBP), proteína surfactante pulmonar-A e D (SP-A e SP-D) e finalmente duas colectinas plasmáticas presentes somente em bovídeos, a congulinina e colectina-43 (CL-43). Essas proteínas são sintetizadas pelo fígado, ligam-se a uma variedade de microrganismos Gram positivos e negativos, além de leveduras parasitas e vírus, agindo como opsoninas, promovendo a fagocitose através da interação com receptores específicos dos fagócitos. Além disso, a MBP é capaz de ativar o sistema do complemento pela via das lectinas, incrementando a resposta imunológica (HOLMSKOV, 2000). A diminuição nos valores de IF é evidente quando se utilizou uma proporção maior de leveduras (1/180) em ambos os grupos avaliados, sugerindo que em situações críticas de exposição ao patógeno, há uma queda na capacidade fagocitária dos bovinos.

TABELA 3 - Valores médios do índice fagocitário (IF) total e diferencial de fagócitos em duas concentrações de leveduras ($1/45$ e $1/180$), sensibilizadas (S) e não sensibilizadas (NS), em vacas de raças naturalizadas (G1) e mestiças $3/4$ Nelore X Simental (G2)

IF	Naturalizadas				$3/4$ Nelore X Simental			
	$1/45$ S	$1/45$ NS	$1/180$ S	$1/180$ NS	$1/45$ S	$1/45$ NS	$1/180$ S	$1/180$ NS
IF total	19,50	11,11	20,98	6,56	75,69	4,17	29,81	5,32
IF de neutrófilos	27,88	20,54	35,99	10,42	145,21	5,73	62,52	6,13
IF de monócitos	16,39	9,44	14,16	4,78	25,77	3,06	16,18	8,97
IF de eosinófilos	14,22	3,35	12,79	4,46	61,15	4,00	10,72	0,87

4. CONCLUSÃO

O resultado da aderência revelou que os animais do grupo 1, raças naturalizadas, possuem maior capacidade de aderência que os animais do grupo 2, animais mestiços. O número de células aderidas em bovinos foi menor que o número de células que aderem em humanos. Não houve diferença significativa entre os índices fagocitários, sugerindo que receptor Fc e complemento podem ter um papel fundamental na via de ativação da fagocitose. Exceto na concentração 1/45 de leveduras não sensibilizadas, onde o grupo 1 apresentou maior índice fagocitário sugerindo que apesar das similaridades entre os grupos, a ativação do sistema fucose e manose é mais significativa em vacas naturalizadas.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

HOLMSKOV, U. Collectins and collectin receptors in innate immunity. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. Supplement**, Copenhagen, v.100, p.1-59, 2000.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PEÇANHA, L. M. F.; SILVA-FILHO, V. L.; CARDOSO, M. C. A.; TOSTA, C. E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.10, n. 6, p. 1096–1102, 2003.

FONTE DE FINANCIAMENTO – Ministério da Integração Nacional e CNPq

¹ Aluna de Iniciação Científica. Escola de Veterinária. UFG. adriana_bitt@hotmail.com

² Médica Veterinária, Pós-Graduação em Ciência Animal. EV/UFG. rrinbox@gmail.com

³ Médica, Professora da FAMED. UnB. mimjunqueira@unb.br

⁴ Aluna de Iniciação Científica. EV/UFG. saurasouza@hotmail.com

⁵ Técnico do Laboratório de Patologia Clínica. HV/UFG. heltonfo@hotmail.com

⁶ Técnica do Laboratório de Imunologia Celular. UnB. shirleycouto@unb.br

⁷ Orientadora. EV/UFG. clorinda@vet.ufg.br